

Robuste Detektion und Quantifizierung niedermolekularer Substanzen mittels oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie



seit 1558

Dissertation

(kumulativ)

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc. Martin Jahn
geboren am 28. September 1986 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jürgen Popp, *Friedrich-Schiller-Universität Jena*
2. Prof. Dr. Volker Deckert, *Friedrich-Schiller-Universität Jena*

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.04.2017

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Jürgen Popp für das ausgesprochen interessante Thema danken, welches ich in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten durfte, sowie für die vielen wertvollen Anregungen und Ratschläge, mit welchen er mir in den letzten Jahren zur Seite stand. Durch seine hilfreichen Anmerkungen und Kommentare konnte ich zudem viel über wissenschaftliches Arbeiten, Präsentieren und Schreiben lernen. Ein besonders großes Dankeschön gebührt zudem Dr. Dana Cialla-May und Dr. Karina Weber. Ihre fortwährende Betreuung und Unterstützung hat meine Dissertation erst möglich gemacht. Ihre Hilfe bei der Planung und Durchführung von Experimenten, dem Verfassen wissenschaftlicher Texte und der Erstellung von Präsentationen hat mir sehr geholfen meine eigenen Fähigkeiten weiterzuentwickeln. Vielen Dank dafür.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Dr. Thomas Bocklitz, der mir mit Rat, Tat und viel Geduld bei allen Problemen aus der Statistik, der Datenanalyse und mit der Programmiersprache R zur Seite stand. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Claudia Beleites, Konstanze Olschewski, Bernd Kampe und Oleg Ryabchykov für gute Ratschläge und tolle Anregungen beim Erstellen von Skripten sowie dem Lösen vielfältiger Probleme bedanken.

Ein großes Dankeschön geht zudem an Vlastimil Peksa und seine Kollegen von der Karls-Universität (Univerzita Karlova) in Prag für die außerordentlich gute und fruchtbare Zusammenarbeit, aus welcher der Artikel zum Nachweis von Azorubin in Süßgetränken entstanden ist. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei unserem Kooperationspartner Food GmbH Jena, insbesondere bei Volker Schulz, für die Durchführung der Referenzmessungen des Azorubin-Gehaltes der Getränkeproben bedanken. Zudem gilt mein Dank Ulrike Elstner, die mich bei weiterführenden Arbeiten zur Untersuchung von Sudanfarbstoffen in Lebensmittelproben unterstützt und dabei ihre Staatsexamensarbeit angefertigt hat.

Großer Dank gebührt ebenso Prof. Dr. Matthias Pletz, dessen Hilfe und Ratschläge für die Studien zur Medikamentenüberwachung unersetzbar waren und dessen Korrekturen und Anmerkungen zur Qualität der Manuskripte beigetragen haben. Ihm sowie Dr. Ute Neugebauer und Johanna Kirchhoff ist es zudem zu verdanken,

dass in den Arbeiten Urinproben von Patienten untersucht werden konnten. Außerdem möchte ich Dr. Dirk Bender für die Durchführung von DFT-Rechnungen zum LVX-Molekül danken.

Mein Dank gilt zudem Dr. Thomas Mayerhöfer für viele Anregungen zu neuen Ideen und Projekten, tolle Gespräche auf dem Weg zur Mensa oder beim Kaffee über Gott und die Welt sowie die Durchführung von Simulationen zur Optimierung plasmonischer Strukturen. Die Realisierung dieser wäre ohne die Hilfe von Dr. Uwe Hübner und seinem Reinraum-Team nicht denkbar gewesen. Für die großartige Zusammenarbeit in den letzten Jahren möchte ich mich hier ebenso bedanken, wie für die Geduld mit mir und meinen oft viel zu kurzfristigen Anfragen. Außerdem möchte ich Franka Jahn, Andrea Dellith und Jan Dellith für viele schöne REM-Aufnahmen danken, die oft zu interessanten Erkenntnissen und somit sehr zu meiner Arbeit beigetragen haben.

Doch was wäre all die Arbeit ohne ein gutes Arbeitsklima? Dieses wurde stets von meinen lieben Kollegen von der JBCI zur Verfügung gestellt, welchen ich hiermit meinen Dank aussprechen möchte. Einer Kollegin gilt dabei mein ganz besonderer Dank, meiner Ehefrau Izabella Jahn. Ich bin ihr nicht nur dankbar für die tolle Zusammenarbeit und die vielen, hilfreichen wissenschaftlichen Gespräche, die wir geführt haben, sondern ganz besonders dafür, dass sie stets an meiner Seite stand, mich seelisch und moralisch unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Vielen lieben Dank dafür! Ganz besonders möchte ich zudem Andreea Radu danken, die wie eine Schwester für mich geworden ist, sowie meinen Kollegen und Freunden Sophie Patze, Sezin Yüksel, Vera Dugandzic, Xiao-Shan Zheng, Melina Yarbakht, Olga Zukovskaja, Barbara Seise, Maria Küllmer, Clara Stiebing und Richard Knipper für die vielen Kaffeerunden, ihre Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen und die sozialen Aktivitäten, die wir gemeinsam unternommen haben. Ich möchte an dieser Stelle auch all jenen Danken, die ich hier nicht alle im Einzelnen aufzählen kann, den vielen weiteren Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Popp sowie allen Kollegen des IPHT, die mich in den letzten Jahren immer gut unterstützt haben. Ihnen gilt mein Dank.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Oma und meiner gesamten Familie ein riesengroßes Dankeschön aussprechen. Sie haben mich stets bei all meinen Vorhaben unterstützt, haben mir geholfen, wo es nur ging, und haben mich wieder aufgebaut, wenn es mir mal nicht so gut ging. Vielen lieben Dank dafür!

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Alternierende kleinste Quadrate; engl.: Alternating least squares
CV	Kreuzvalidierung; engl.: Cross validation
EGNP	Enzymatisch generierte Silbernanopartikel; engl.: Enzymatic generated silver nanoparticles
ELISA	Engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay
FON	Engl.: Film over nanosphere
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; engl.: High-performance liquid chromatography
HV	Gesunder Spender; engl.: Healthy volunteer
LC	Flüssigkeitschromatographie; engl.: Liquid chromatography
LoC	Engl.: Lab-on-a-Chip
LSL	Lipophile Sensorschicht; engl.: Lipophilic sensor layer
LVX	Levofloxacin
MAPE	Mittlerer absoluter prozentualer Fehler; engl.: Mean absolute percentage error
MCR	Engl.: Multivariate curve resolution
MLR	Multiple lineare Regression
MS	Massenspektrometrie
MTX	Methotrexat
NTX	Nitroxolin
PCA	Hauptkomponentenanalyse; engl.: Principal component analysis

PCR	Hauptkomponentenregression; engl.: Principal component regression
PLSR	Regression mit partiellen kleinsten Quadraten; engl.: Partial least squares regression
PS	Patientenprobe; engl.: Patient sample
RMSEP	Mittlerer quadratischer Vorhersagefehler; engl.: Root mean square error of prediction
SAM	Standardadditionsmethode
SAS	Standardadditionsschritte
SERRS	Oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie; engl.: Surface enhanced resonance Raman spectroscopy
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie; engl.: Surface enhanced Raman spectroscopy
SI	Ergänzende Informationen; engl. Supplementary information
SNIP	Engl.: Statistics-sensitive non-linear iterative peak-clipping
SPP	Oberflächenplasmon-Polariton; engl.: Surface plasmon polariton
TDM	Medikamentenüberwachung; engl.: Therapeutic drug monitoring

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	5
I. Einleitung	9
1. Motivation	9
2. Stand der Forschung	13
2.1. Chemische Analyse in den Lebenswissenschaften - Methoden für die Medikamenten- und Lebensmittelüberwachung	13
2.2. Robuste qualitative und quantitative Untersuchungen mittels SERS	15
2.2.1. Grundlegendes zur Raman- und SERS-Spektroskopie	15
2.2.2. Experimentelle Ansätze	20
2.2.3. Chemometrische Ansätze	25
2.3. SERS-basierte Analyse in den Lebenswissenschaften	31
2.3.1. Lebensmittelsicherheit und Qualitätskontrolle	31
2.3.2. Überwachung von Medikamenten in Körperflüssig- keiten	33
3. Eigene Forschungsergebnisse	35
3.1. Nachweis bedenklicher Farbstoffe in Lebensmittelproben	35
3.2. Quantifizierung klinisch relevanter Moleküle	41
3.2.1. Univariate Kalibrierung für die Ermittlung der Nach- weisgrenze und des linearen Bereichs	43
3.2.2. Multivariate Kalibrierung für quantitative Analysen in komplexen Probenmatrizes	46
3.2.3. Standardadditionsmethode für stark variierende Pro- benmatrizes	50
3.3. Abschließende Bemerkungen	54
Literaturverzeichnis	57

II. Publikationen und Konferenzbeiträge	69
1. Publikationen	69
1.1. Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks [VP]	71
1.2. Towards SERS based applications in food analytics: Lipophilic sensor layers for the detection of Sudan III in food matrices [MJ]	83
1.3. LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate [IH1]	93
1.4. Droplet based microfluidics: spectroscopic characterization of levofloxacin and its SERS detection [IH2]	101
1.5. Toward Levofloxacin Monitoring in Human Urine Samples by Employing the LoC-SERS Technique [IH3]	109
1.6. Lab-on-a-Chip-Surface Enhanced Raman Scattering Combined with the Standard Addition Method: Toward the Quantification of Nitroxoline in Spiked Human Urine Samples [IH4]	131
Autorenbeiträge	151
2. Weitere Publikationen	161
3. Konferenzbeiträge	161
Lebenslauf	163
Selbstständigkeitserklärung	165

Zusammenfassung

Eine große Herausforderung in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften ist die zuverlässige Detektion und Quantifizierung einzelner Substanzen in komplexen Probengemischen. Fälle in denen Melamin zu Milchprodukten oder Säuglingsnahrung zugesetzt wurde sowie Beimengungen karzinogener Azofarbstoffe in rötlich gefärbten Gewürzen, Ölen und Saucen verdeutlichen die hohe gesellschaftliche Relevanz derartiger Fragestellungen. Zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit besteht daher ein hoher Bedarf nach schnellen und einfach durchführbaren Analyseverfahren, die sich zudem vor Ort durchführen lassen und niedrige Kosten aufweisen. Die selben Anforderungen können ebenso für die klinische Analytik aufgestellt werden. Ein relativ junges, aber stetig an Bedeutung gewinnendes Feld, für welches analytische Verfahren die Grundlage bilden, ist die Medikamentenüberwachung (TDM; engl.: *Therapeutic drug monitoring*). Durch die Kenntnis des Medikamentenspiegels während der Therapie kann die medikamentöse Behandlung optimiert und so den persönlichen Bedürfnis des Patienten angepasst werden. Dies spielt besonders für die intensivmedizinische Behandlung eine große Rolle, da hier eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen verabreicht wird, deren Wechselwirkung untereinander sich entscheidend auf die Wirkung einzelner Medikamente auswirkt.

Als Referenzmethode in den angeführten Anwendungsfeldern dienen nach wie vor chromatographische Verfahren. Ihr hoher technischer und präparativer Aufwand sowie die geringe Automatisierbarkeit limitieren jedoch die Geschwindigkeit und das Potential für Vor-Ort-Einsätze. Zudem führt die mangelnde Standardisierung der Technik zu einer geringen Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labore. Im Gegensatz hierzu bieten *Immunoassays*, die in Form kompletter Pakete kommerziell erhältlich sind, standardisierte Protokolle sowie einen hohen Automatisierungsgrad. Allerdings ist die Entwicklung neuer *Assays* aufwändig, weshalb sie nur für eine limitierte Anzahl an Medikamenten vorhanden sind. Eine weitere Problematik stellen Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen oder Metaboliten der Analyten dar.

Auf der Suche nach Alternativen sind, in den letzten Jahren, spektroskopische Verfahren in den Fokus der Forschung gerückt. Ein Vertreter dieser Methoden, mit hohem Potential für die Detektion niedermolekularer Substanzen in Probengemi-

Zusammenfassung

schen, stellt die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS; engl.: *Surface enhanced Raman spectroscopy*) dar. Diese beruht auf der inelastischen Streuung von Photonen an Molekülen, wobei die Signalverstärkung durch die plasmonischen Eigenschaften metallischer Nanopartikel bzw. -strukturen ausgenutzt wird. Somit zeichnet sich die SERS-Spektroskopie durch eine hohe Sensitivität kombiniert mit der molekularen Spezifität der Raman-Spektroskopie aus. Die geringe Reproduzierbarkeit, ein Mangel an Automatisierung sowie negative Einflüsse der Probenmatrix auf die Ergebnisse stellen derzeit jedoch Hindernisse für die Anwendung in der Routineanalytik dar. Um diese Herausforderungen bewältigen zu können müssen experimentelle Faktoren gleichermaßen wie die Datenauswertung adressiert werden.

In der vorliegenden Dissertation steht die Quantifizierung niedermolekularer Substanzen in Probenmatrices unterschiedlicher Komplexität, auf Basis der SERS-Spektroskopie, im Vordergrund der Untersuchung. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Entwicklung geeigneter, automatisierbarer Strategien für eine robuste Auswertung spektraler Daten, trotz störender Einflüsse durch die Probenmatrix. Hierzu wurden konkrete Beispiele aus den Anwendungsfeldern der Lebensmittelüberwachung und der TDM untersucht. Für den ersten Teil der Arbeit wurden planare SERS-Substrate eingesetzt, um die Detektion der beiden gesundheitsbedenklichen Azofarbstoffe Sudan III und Azorubin zu realisieren. Dabei konnte der Gehalt von Azorubin in Süßgetränken erfolgreich, unter Zuhilfenahme eines univariaten Kalibriermodells auf Basis der Fläche einer einzelnen Markerbande, bestimmt werden. Derartige Ansätze versagen jedoch, sobald das Untergrundsignal der Probenmatrix das Analytsignal dominiert, wie dies bei Sudan III versetzten Paprikaextrakten der Fall ist. Hierfür wurde eine Oberflächenmodifizierung entwickelt, die gezielt eine Anreicherung des Analyten ermöglicht und gleichzeitig unerwünschte Beiträge der Probenmatrix reduziert. Zusätzlich wurde eine teilautomatisierte Routine für die Datenvorbehandlung und die sich daran anschließende Analyse dieser, auf Basis eines multivariaten Modells, entworfen. Die Kombination aus Hauptkomponentenanalyse (PCA; engl.: *Principal component analysis*) und Regression mit partiellen kleinsten Quadraten (PLSR; engl.: *Partial least squares regression*) erlaubt es hierbei ein Modell zu trainieren, dass quantitative Untersuchungen von Sudan III in Anwesenheit stark störender Matrixbestandteile gewährleistet.

Im zweiten Teil wurde das Potential unterschiedlicher chemometrischer Methoden für die Überwachung des Medikamentenspiegels auf Basis der SERS-Spektroskopie untersucht. Als Anwendungsbeispiele dienten dabei das Chemotherapeutikum Methotrexat (MTX) sowie die beiden Antibiotika Levofloxacin (LVX) und Nitroxolin (NTX). Durch die Nutzung eines Mikrofluidik-Chips konnten automatisiert große

Datensätze aufgenommen und die Zuverlässigkeit der Resultate erhöht werden. Anhand wässriger Lösungen wurden prinzipielle Parameter, wie die Nachweisgrenze und der lineare Bereich, auf Basis der Fläche ausgewählter Markerbanden bestimmt. In weiterführenden Experimenten konnten LVX und NTX erfolgreich in simuliertem Urin und Urinproben von gesunden Spendern und Patienten quantifiziert werden. Hierzu kam zunächst das zweistufige PCA-PLSR-Modell zum Einsatz, das ebenfalls für den Nachweis von Sudan III verwendet wurde. Auf diese Weise konnte die Konzentration von LVX, trotz des ausgeprägten Untergrundsignals des Urins, zuverlässig bestimmt werden. Die hohe Variabilität des Urins erschwert jedoch den Transfer von Kalibriermodellen auf unabhängige Testproben. Um diese Herausforderung zu bewältigen wurden, im Fall von NTX, die Informationen des Analyten zunächst unter Anwendung einer multivariaten Methode zur Zerlegung von Mischspektren, der *Multivariate Curve Resolution* (MCR), extrahiert und anschließend die Standardadditionsmethode (SAM) zur Berechnung der unbekannten Konzentration genutzt. Basierend auf diesen Ansatz lässt sich eine automatisierte Untersuchung von Urin auf wasserlösliche Bestandteile basierend auf der SERS-Spektroskopie realisieren.

Abstract

A major challenge in many areas of life sciences is the reliable detection and quantification of individual substances in complex sample mixtures. Cases in which melamine was added to milk products or infant formulas as well as the admixture of carcinogenic azo dyes in reddish spices, oils and sauces illustrate the high social relevance of such questions. In order to ensure food safety, there is therefore a great need for fast and easy to perform analytical methods, which are cost-effective and enable on-site applications. The same requirements can also be set for clinical analysis. A relatively young, but increasingly important, field for which analytical procedures form the basis is the therapeutic drug monitoring (TDM). Based on the knowledge of the drug level during the therapy, the medication can be optimized and adapted to the personal needs of the patient. This is of particular importance for intensive medical treatment, since a large number of different substances are administered here, whose interaction has a significant influence on the effect of the individual drug.

Chromatographic methods still serve as the reference method in the aforementioned application fields. However, their high technical and preparative effort as well as the low degree of automation limit the speed of analysis and the potential for on-site operations. Moreover, the lack of standardization of the technique leads to a low comparability of the results of different laboratories. In contrast, immunoassays, which are commercially available in the form of complete kits, offer standardized protocols as well as a high level of automation. However, the development of new assays is complex, wherefore they are only available for a limited number of drugs. A further problem is cross-reactivity with other substances or metabolites of the analytes.

In the search for alternatives, spectroscopic methods have been put into the focus of research in recent years. A possible candidate, which has high potential for the detection of low molecular weight substances in sample mixtures, is the surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). This technique is based on the inelastic scattering of photons on molecules, whereby the signal enhancement originated from the plasmonic properties of metallic nanoparticles or structures is used. Thus, SERS

Abstract

spectroscopy is characterized by a high sensitivity combined with the molecular specificity of Raman spectroscopy. However, the low reproducibility, a lack of automation as well as the negative influence of the sample matrix on the results are currently hindering the application in routine analysis. In order to overcome these challenges, experimental factors must be addressed in the same way as the data analysis.

This dissertation deals with the SERS-based quantification of low molecular weight substances in sample matrices of different complexity. The main focus is on the development of suitable, automatable strategies for a robust analysis of spectral data despite disturbing influences by the sample matrix. In the first part of the study, the results on the detection of the two health-threatening azo dyes Sudan III and Azorubin based on planar SERS-substrates are presented. The content of azorubine in sweet drinks was successfully determined by the aid of an univariate calibration model on the basis of the area of a single marker band. However, such approaches fail as soon as the background signal of the sample matrix dominates the analyte signal, as is the case with Sudan III in paprika extracts. For this purpose, a surface modification was developed, which allows a targeted enrichment of the analyte. At the same time unwanted contributions of the sample matrix gets reduced. In addition, a partially automated data preprocessing and analysis routine was developed. The combination of the principal component analysis (PCA) and the partial least squares regression (PLSR) allows the construction of robust models for the quantification of Sudan III in the presence of highly interfering matrix effects.

In the second part, the potential of different chemometric methods for monitoring the drug level based on SERS spectroscopy was investigated. For this purpose, the chemotherapeutic agent methotrexate (MTX) and the two antibiotics levofloxacin (LVX) and nitroxolin (NTX) served as examples. By using a microfluidic chip, large data sets could be recorded in an automated manner and the reliability of the results could be increased. Based on aqueous solutions, basic parameters, such as the detection limit and the linear range, were determined by the help of the area of selected marker bands. In further studies, LVX and NTX were successfully quantified in simulated urine and urine samples from healthy donors and patients. The two-step PCA-PLSR model, which was also used for the detection of Sudan III, allows the reliable determination of the LVX concentration despite the pronounced background signal of the urine. The high variability of the urine, however, makes it difficult to transfer calibration models to independent test samples. In order to meet this challenge, another approach was applied for the NTX data. First, the analyte's information was extracted using a multivariate method for the decomposition of

mixed spectra, the multivariate curve resolution (MCR), and then the standard addition method (SAM) was used to calculate the unknown concentration. Based on this technique, an automated investigation of urine for water-soluble components based on SERS spectroscopy can be carried out.

I. Einleitung

1. Motivation

Die chemische Analytik ist aus vielen Lebensbereichen nicht mehr wegzudenken. Breite Anwendungsfelder stellen das Gesundheitssystem sowie verwandte Bereiche, wie die Lebensmittelsicherheit, dar. Aus ärztlicher Sicht stellt sie eine wichtige Grundlage bei der Diagnose von Erkrankungen sowie der Überwachung verschiedener gesundheitsrelevanter Parameter dar. Die Pharma- und Lebensmittelindustrie benötigt analytische Verfahren für die Qualitätssicherung ihrer Produkte. Darüber hinaus werden Lebensmittel von den verantwortlichen Behörden und Institutionen regelmäßig auf bedenkliche Inhaltsstoffe hin untersucht.

Dabei werden hohe Anforderungen an die eingesetzten Methoden gestellt, die über die Gewährleistung zuverlässiger Ergebnisse mit hoher Genauigkeit hinausgehen. So spielen Faktoren wie die Dauer der Untersuchung, personeller und finanzieller Aufwand, die Automatisierbarkeit sowie die Verwendung kompakter Messapparaturen, für einen möglichen Vor-Ort-Einsatz, eine große Rolle bei der Bewertung von Analyseverfahren. Weiterhin ist die Eignung zur Untersuchung von Proben hoher chemischer Komplexität ein wichtiges Kriterium. Jeder zusätzliche Probenaufbereitungsschritt erfordert zusätzliche Gerätschaften, Verbrauchsmaterialien und Zeit, wodurch die Kosten für eine Analyse steigen.

Den Goldstandard in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften bilden Verfahren auf Basis der chromatographischen Auftrennung der zu untersuchenden Proben. Als Ausleseverfahren, der getrennt vorliegenden Probenbestandteile, dienen hierbei für gewöhnlich die Absorptionsspektroskopie oder Massenspektrometrie. Derartige Verfahren verbinden eine hohe Spezifität und Sensitivität mit der Möglichkeit zur parallelen Untersuchung mehrerer Substanzen. Allerdings stehen dem ein hoher apparativer und operativer Aufwand entgegen, wodurch nicht nur die Kosten steigen sondern auch die Einsatzfähigkeit vor Ort und die Automatisierbarkeit limitiert sind. Deutliche Vorteile hinsichtlich einer Automatisierung bieten *Immunoassays*, welche kommerziell, in Form kompletter „Kits“, verfügbar sind und sich mit geringem Aufwand in bestehende Laboratorien integrieren lassen. Dies wirkt sich auch

I. Einleitung

positiv auf die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Labore aus. Ihre hohe Selektivität beruht dabei auf der Verwendung spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen, wobei sensitive Nachweisverfahren, wie die Fluoreszenzmarkierung, zum Einsatz kommen. Die aufwendige Herstellung anwendungsspezifischer Fängermoleküle macht die Methode jedoch unflexibel. Zudem kann es zu unerwünschten Kreuzreaktionen mit Metaboliten oder anderen Substanzen in der Probe kommen, die die Ergebnisse negativ beeinflussen.

Aus diesen Gründen ist der Bedarf nach alternativen Analyseverfahren hoch. Die Entwicklung leistungsfähiger und kompakter Spektrometer hat das Interesse in den letzten Jahren zunehmend auf die molekularspezifischen Methoden der Schwingungsspektroskopie gelenkt. Das ausgeprägte Absorptionsspektrum von Wasser im infraroten Spektralbereich limitiert jedoch den Einsatz der Infrarot-Spektroskopie in den Lebenswissenschaften. Zur Untersuchung von Proben mit einem hohen Wasseranteil ist die Raman-Spektroskopie wesentlich besser geeignet, da der Raman-Streuquerschnitt des Wassers klein ist. Die praktische Anwendbarkeit der Technik ist allerdings durch die geringe Ausbeute inelastisch gestreuter Photonen beschränkt.

Eine Möglichkeit die Sensitivität dieser Methode zu erhöhen bietet die SERS-Spektroskopie. Die Signalverstärkung beruht dabei zu großen Teilen auf der Anregung von Oberflächenplasmon-Polaritonen (SPP; engl.: *Surface plasmon polariton*) in metallischen Nanostrukturen, in deren Nähe sich die Moleküle befinden. Auf diese Weise kann die Nachweisgrenze um mehrere Größenordnungen gesenkt werden. Die Anzahl der auf der SERS-Spektroskopie basierenden Arbeiten zu Fragestellungen aus dem Bereich der Lebenswissenschaften ist daher in jüngerer Zeit deutlich gestiegen. Eine große Herausforderung stellen dabei die Proben selbst dar, bei welchen es sich um komplexe Stoffgemische handelt. Die gemessenen Spektren beinhalten demnach nicht nur Beiträge der Analyten sondern auch anderer Substanzen, die zur inelastischen Lichtstreuung beitragen. Eine hohe Affinität des Analytmoleküls zur Metalloberfläche kann dazu beitragen die Untergrundsignale anderer Probenbestandteile zu reduzieren. Dieser Effekt kann durch die gezielte Modifizierung der Oberflächen zusätzlich verstärkt werden.

Ein weiterer Weg zur Adressierung dieser Problematik stellt die Verwendung von Methoden der multivariaten Statistik dar. Das Ziel ist dabei die Reduzierung der Komplexität des Datensatzes bei Erhaltung der wesentlichen Informationen. Hierzu wird im Allgemeinen eine Transformation der Daten durchgeführt, wobei die gemessenen Variablen (spektrale Kanäle) durch neue, aussagekräftigere Variablen ersetzt werden. Auf der Grundlage der transformierten und entsprechend projizierten Daten kann je nach Problemstellung eine Klassifikation oder Regression durchgeführt wer-

den. Auf diese Weise lassen sich Informationen aus den Spektren extrahieren, welche mittels univariater Methoden nicht zugänglich sind. Zudem können multivariate Modelle einfach in eine automatisierte Datenvorbehandlung und -analyse implementiert werden. Dies in Hinblick auf die Größe der Datensätze, welche typischerweise einige tausend Spektren umfassen, unumgänglich. Zeitgleich lassen sich durch einen hohen Automatisierungsgrad subjektive Einflüsse auf die Analyse der Daten und die damit verbundenen Fehler reduzieren, was zu einer erhöhten Robustheit der Resultate führt.

Im Fokus der vorliegenden Dissertation steht die Quantifizierung niedermolekularer Substanzen in komplexen Probenmatrices mit Hilfe der SERS-Spektroskopie. Hierzu wurden für das jeweilige Anwendungsgebiet geeignete experimentelle Ansätze mit chemometrischen Methoden kombiniert. Da sich der störende Einfluss der restlichen Probenbestandteile auf die gemessenen Spektren aus experimenteller Sicht nur bedingt reduzieren lässt, stellt die Verwendung multivariater Modelle, die dessen ungeachtet eine robuste Auswertung der Daten ermöglicht, ein wichtiges Kernstück der Arbeit dar. In Hinblick auf eine möglichst automatisierte und anwenderfreundliche Vorbehandlung sowie Analyse der Daten sind Funktionen in der freien Programmierungsumgebung *GnuR* erstellt worden. Um die vorgestellten Ansätze für quantitative Analysen auf Basis der SERS-Spektroskopie erproben zu können, wurde sich in den hierzu vorgestellten Arbeiten auf zwei Anwendungsbereiche aus den Lebenswissenschaften beschränkt: Der Kontrolle von Lebensmitteln auf bedenkliche Inhaltsstoffe und der Überwachung des Medikamentenspiegels in Körperflüssigkeiten.

Als Beispiele für den Bereich der Lebensmittelsicherheit dienten die beiden roten Azofarbstoffe Sudan III und Azorubin, deren Konsum gesundheitsschädlich sein kann. Der Einsatz von Azorubin in Nahrungsmitteln ist in der Europäischen Union nicht untersagt, wird jedoch durch Grenzwerte reglementiert. Daher war es möglich kommerziell erhältliche Getränke auf deren Azorubin-Gehalt zu untersuchen. Hierzu konnte ein univariates Modell auf der Grundlage der Fläche einer Markerbande trainiert und erfolgreich zur Vorhersage eingesetzt werden. Sudan III ist hingegen nicht als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen, wird allerdings missbräuchlicherweise, vor allem in Gewürzmischungen und Palmöl, eingesetzt. Durch den Einsatz von oberflächenmodifizierten SERS-Substraten konnte das Untergrundsignal wasserlöslicher Konkurrenz-moleküle, die zur Simulation störender Probenbestandteile verwendet wurden, reduziert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Verwendung eines zweistufigen, multivariaten Kalibriermodells, auf Basis der PCA und der PLSR, quantitative Messungen des Farbstoffs in Anwesenheit der Konkurrenz-moleküle er-

I. Einleitung

möglichst. Darüber hinaus wurden Paprikaextrakte künstlich mit Sudan III versetzt, welches anschließend erfolgreich in den Proben nachgewiesen werden konnte.

Bei der TDM wird das Ziel verfolgt, die Dosis auf der Grundlage des während der Therapie gemessenen Medikamentenspiegels zu optimieren.[1, 2] Da die Aufnahme und Wirksamkeit vieler Medikamente entscheidend von individuellen Faktoren abhängig ist, wie den aktuellen Lebensumständen, der medizinischen Vorgeschichte oder genetischer Faktoren, tragen die daraus gewonnenen Informationen zu einer personalisierten Behandlung bei. Auf diese Weise lässt sich eine Unter- sowie Überdosierung vermeiden, wodurch ein effizienter Einsatz des Medikaments gewährleistet werden kann. Im konkreten Fall wurde das Chemotherapeutikum MTX sowie die beiden Antibiotika, LVX und NTX, in unterschiedlich komplexen Probengemischen untersucht. In Vorversuchen konnten anhand wässriger Proben grundlegende Parameter für eine Quantifizierung sowie zum allgemeinen Umgang mit den Analyten gewonnen werden. Unter Verwendung von simuliertem Urin und klinischen Proben wurde anschließend die prinzipielle Durchführbarkeit quantitativer Messungen in komplexen Stoffgemischen erprobt. Hierfür kam das bereits getestete PCA-PLSR-Kalibriermodell zum Einsatz. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung von LVX trotz der Untergrundsignale des Urins möglich ist. Die stark variierender Zusammensetzung der Proben erschwert jedoch den Transfer von Kalibriermodellen zur Bestimmung der Konzentration in unabhängigen Modellen. Um diese Problematik adressieren zu können, wurde die SAM, anstelle einer Kalibrierung, eingesetzt. Dabei zeigte sich eine Verbesserung der Genauigkeit der Ergebnisse durch den Einsatz der MCR-ALS. Die Kombination der multivariaten Methode mit der SAM stellt somit einen vielversprechenden Ansatz zur Quantifizierung von Medikamenten in Körperflüssigkeiten mit Hilfe der SERS-Spektroskopie dar.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst ein kurzer Abriss über die Standardmethoden zur Medikamenten- und Lebensmittelüberwachung gegeben sowie in die Grundlagen der Raman- und SERS-Spektroskopie eingeführt. Dabei wird insbesondere auf experimentelle und chemometrische Ansätze eingegangen, die zu einer zuverlässigeren Analyse auf Basis der SERS-Spektroskopie beitragen können. Zudem wird ein Überblick über die Literatur zur Verwendung von SERS in den beiden als Beispiel gewählten Anwendungsbereichen gegeben. Daran anschließend werden die Ergebnisse zur Quantifizierung illegaler Farbstoffe in Lebensmitteln und von Medikamenten in Körperflüssigkeiten vorgestellt und diskutiert.

2. Stand der Forschung

2.1. Chemische Analyse in den Lebenswissenschaften - Methoden für die Medikamenten- und Lebensmittelüberwachung

Im klinischen Bereich stellen *Immunoassays* und die Flüssigkeitschromatographie (LC; engl.: *Liquid chromatography*) die beiden vorherrschenden analytischen Techniken dar [3]. Die LC bildet zudem die Grundlage für die meisten Verfahren der Lebensmittelanalytik, wobei auch hier vereinzelt *Immunoassays* eingesetzt werden können [4].

Die LC ist eine Methode zur Auftrennung sich in Lösung befindlicher Stoffgemische, basierend auf der chemischen oder physikalischen Wechselwirkung dieser mit der sogenannten stationären Phase. Dabei handelt es sich im Fall der häufig eingesetzten Hochleistungs-LC (HPLC; engl.: *High-performance LC*) um ein poröses Material, welches sich in einer Säule befindet. Dieses wird von der Probelösung, auch mobile Phase genannt, unter hohem Druck durchflossen. Da die verschiedenen Bestandteile der Lösung unterschiedlich lange Zeiten zum Durchlaufen der Säule benötigen, werden sie räumlich aufgetrennt. Anschließend wird ein Detektor für den Nachweis der aufgetrennten Substanzen benötigt. Die beiden gängigsten Methoden sind die UV-VIS-Absorptionsspektroskopie sowie die Massenspektrometrie (MS). Im direkten Vergleich ermöglicht die technisch aufwändigere HPLC-MS die kürzeren Durchlaufzeiten und weist zudem eine höhere Sensitivität und Spezifität auf [5].

Immunoassays beruhen auf der spezifischen Bindung zwischen Antikörpern und Antigenen [6]. Im einfachsten Fall dient ein Antikörper, der auf einer Polymeroberfläche immobilisiert wurde, als Fängereinheit für den Analyten. Ein weiterer Antikörper, der zuvor mit einem Reporter versehen wurde, bindet an den gebundenen Analyten und dient letztendlich dem Nachweis. Bei dem Reporter kann es sich beispielsweise um ein Radioisotop oder einen Fluoreszenzfarbstoff handeln. Diese Variante wird zumeist als „*Sandwich*“-Verfahren bezeichnet, da sich der gebundene Analyt zwischen dem Fänger- und Reporterantikörper befindet. Eine weitere Variante wird als ELISA (engl.: *Enzyme-linked immunosorbent assay*) bezeichnet. Hierbei wird als Reporter ein Enzym verwendet, dessen spezifische katalytische Wirkung die Änderung der optischen Eigenschaften bestimmter Moleküle in der Lösung bewirkt.

Die Verwendung beider Methoden ist mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen verbunden [3]. Die HPLC-MS bietet für gewöhnlich die höhere Sensitivität, im

I. Einleitung

Vergleich beider Techniken, und die Möglichkeit in einem einzigen Durchlauf eine große Anzahl an Analyten parallel zu untersuchen. Zudem ist die Entwicklung neuer Protokolle für sich ändernde Analyseaufgaben vergleichsweise einfach und schnell, was zu einer hohen Flexibilität führt. Ein Nachteil ist die Anfälligkeit der HPLC-MS auf Einflüsse jener Probenbestandteile, die nicht im Fokus der Untersuchung stehen, der sogenannten Probenmatrix. Daher sind aufwendige Extraktions- und Aufreinigungsverfahren notwendig. Dies bedeutet zusätzliches Laborequipment, längere Analysezeiten und einen größeren Arbeitsaufwand. Zudem wird für die Analyse spezialisiertes Personal benötigt und eine Automatisierung ist nur bedingt möglich. Ein weiterer Nachteil ist die Tatsache, dass nur wenige standardisierte Protokolle zur Verfügung stehen und somit die Vergleichbarkeit von Resultaten verschiedener Labore schwankt.

Immunoassays werden hingegen kommerziell, als fertige „Kits“ vertrieben. Daher ist die Vergleichbarkeit von Resultaten höher und die standardisierten Protokolle sowie der hohe Automatisierungsgrad ermöglichen die Durchführung einer Analyse durch weniger spezialisiertes Personal. Automatisierte Verfahren sind zudem weniger anfällig für subjektive Fehler. Die Kreuzreaktivität mit anderen Substanzen der Probenmatrix oder Metaboliten des Analyten stellt jedoch einen Nachteil von *Immunoassays* dar. Hinzu kommt die mangelnde Flexibilität der Methode, da spezifische Antikörper oder -gene benötigt werden, deren Herstellung aufwendig ist. Daraus ergeben sich auch die hohen Kosten für eine einzelne Analyse.

Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahrzehnten, neben der Weiterentwicklung beider Techniken, vermehrt nach alternativen Ansätzen gesucht. Verfahren, die auf der molekularspezifischen Raman- und Infrarot-Spektroskopie beruhen, haben in dieser Zeit deutlich an Bedeutung in den Anwendungsfeldern der Lebenswissenschaften gewonnen [7–13]. Eine entscheidende Rolle spielen dabei das große Potential dieser Techniken eine schnelle und automatisierte Analyse zu ermöglichen, wobei sich mehrere Substanzen parallel untersuchen bzw. überwachen lassen. Weiterhin sind kompakte und robuste optische Spektrometer erhältlich, welche Analysen vor Ort ermöglichen. Die Raman-Spektroskopie eignet sich zudem, im Gegensatz zur Infrarot-Spektroskopie, zur Untersuchung von Proben mit einem hohen Wasseranteil bzw. in wässriger Lösung, da die Signale des Wassers die Messungen nur geringfügig beeinflussen. Dadurch können viele medizinische und biologische Fragestellungen sowie Analyseaufgaben aus den Bereichen der Lebensmittel- und Umweltsicherheit direkt adressiert werden.

2.2. Robuste qualitative und quantitative Untersuchungen mittels SERS

2.2.1. Grundlegendes zur Raman- und SERS-Spektroskopie

Der Raman-Effekt beruht auf der inelastischen Streuung von Licht, hervorgerufen durch die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Schwingungs- und Rotationsanregungen in Molekülen, bei denen eine Änderung der Polarisierbarkeit auftritt.[14, 15] Als Folge der Interaktion des Moleküls mit dem einfallenden Photon findet ein Übergang zwischen zwei stationären Zuständen über einen virtuellen Zustand¹ statt. Befindet sich das Molekül zuvor im niedrigsten Niveau des elektronischen Grundzustandes, so kann ein Übergang zu einem angeregtem Niveau des Grundzustandes stattfinden. Dabei wird das einfallende Photon der Energie² $\hbar\omega_0$ annihilert und ein Photon niedrigerer Energie $\hbar(\omega_0 - \omega_{vib})$ erzeugt. Dieser Prozess wird als Stokes-Raman-Streuung bezeichnet. Der umgekehrte Prozess, bei dem ein Übergang von einem angeregtem Zustand zurück zum Grundzustand des elektronischen Grundzustandes stattfindet, wird als Anti-Stokes-Raman-Streuung bezeichnet. Das hierbei erzeugte Photon weist eine höhere Energie $\hbar(\omega_0 + \omega_{vib})$ als das Einfallende auf.

Der Anteil inelastisch zu elastisch gestreuter Photonen ist sehr gering [15], wodurch die Empfindlichkeit der Raman-Spektroskopie limitiert ist. Zur Auffindung geringster Analytmengen werden daher Methoden zur Verstärkung der intrinsisch schwachen Raman-Signale benötigt. Stimmt die Energie der einfallenden Strahlung mit der Energie für einen Dipolübergang des Moleküls überein, so findet die sogenannte Resonanz-Raman-Streuung statt [16]. In diesem Fall wird die Intensität jener Raman-Banden verstärkt, deren zugehörige Schwingungen Beiträge des entsprechenden elektronischen Übergangs aufweisen. Dabei kann eine Signalverstärkungen um bis zu sechs Größenordnungen, im Vergleich zur nicht-resonanten Anregung, beobachtet werden [17]. Allerdings muss bei fluoreszierenden Molekülen die Stokes-Verschiebung zwischen Absorption und Emission groß genug sein, sodass das Fluoreszenzsignal die Raman-Banden nicht störend überlagert.

Eine weitere, häufig verwendete Methode zur Signalverstärkung stellt die SERS-Spektroskopie dar. Werden die Analytmoleküle in geringen Abstand zu metallischen Nanostrukturen gebracht, kann eine Erhöhung der Intensität um mehrere Größen-

¹Virtuelle Zustände folgen aus der Störungstheorie und stellen keine Lösung der zeitunabhängigen Schrödingergleichung und somit keine stationären Zustände des Systems dar.

²Für die Kreisfrequenz ω_0 gilt $\omega_0 = 2\pi\nu_0 = 2\pi c_0 \tilde{\nu}_0 = 2\pi c_0 / \lambda_0$, wobei ν_0 die Frequenz, $\tilde{\nu}_0$ die absolute Wellenzahl und λ_0 die Wellenlänge der einfallenden elektromagnetischen Welle sind. c_0 steht dabei für die Vakuumlichtgeschwindigkeit.

I. Einleitung

ordnungen beobachtet werden. Dieser Verstärkungseffekt beruht auf mehreren Beiträgen, welche aus dem Überlapp der Wellenfunktionen von Molekül und Metall resultieren und unter dem Begriff chemischer Mechanismus zusammengefasst werden [18], sowie dem elektromagnetischen Mechanismus, dessen Grundlage die resonante Anregung von SPP in den metallischen Nanostrukturen ist [19]. Hierbei handelt es sich um Oszillationen der Ladungsträgerdichte, welche mit der einfallenden elektromagnetischen Welle koppeln. Da die Feldverstärkung propagierender SPP im Allgemeinen gering ist, dominiert in den meisten Fällen der Beitrag lokalisierter SPP [20].

Für die maximale Verstärkung muss die Resonanzfrequenz der SPP mit der Frequenz des Anregungslichts übereinstimmen. Die spektrale Lage der Resonanz hängt im Fall lokalisierter SPP wesentlich von der Größe und Geometrie der Strukturen sowie den dielektrischen Eigenschaften des Metalls und Umgebungsmediums ab [21]. Ein einfach zu behandelndes Beispiel stellt ein sphärisches Nanopartikel dar, dessen Größe klein im Verhältnis zur Wellenlänge des einfallenden Lichts ist ($\varnothing \approx \lambda/20$). Dieses kann im Rahmen der elektrostatischen Approximation behandelt werden. Für das Feld im inneren der Kugel folgt daraus

$$E_{in} = \frac{3\epsilon_M}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_M} E_0,$$

wobei E_0 das einfallende elektrische Feld, ϵ_M die dielektrische Konstante des Umgebungsmediums und $\epsilon(\omega)$ die dielektrische Funktion des Materials der Kugel sind. Geht der Nenner gegen null, wird das Feld maximal und man spricht vom Resonanzfall. Die dielektrische Funktion des Materials, aus welchem die Kugel gefertigt ist, muss dafür die Bedingung $Re(\epsilon(\omega)) \approx -2\epsilon_M$ erfüllen. Gleichzeitig sollte die Absorption möglichst gering sein, was gleichbedeutend mit $Im(\epsilon(\omega)) \approx 0$ ist. Im sichtbaren Bereich kommen daher die Edelmetalle Silber und Gold sowie Aluminium als Materialien für plasmonische Strukturen in Frage [22].

Die Oszillation der Leitungselektronen bewirkt eine Ladungstrennung zwischen den positiv geladenen Atomrümpfen und der Elektronenwolke [19]. Das dadurch induzierte Dipolmoment verhält sich wie ein Hertz'scher Dipol, der Licht der selben Frequenz aussendet. Dieser elastische Streuprozess geht mit einem lokal verstärktem, elektrischen Nahfeld einher, welches mit Molekülen im geringen Abstand zur Metalloberfläche wechselwirkt. Das dabei inelastisch gestreute Licht, mit der Frequenz $\omega_0 \pm \omega_{vib}$, kann wiederum SPP in der Nanostruktur anregen und wird über einen elastischen Streuprozess ins Fernfeld abgestrahlt. Die Intensität der gemessenen Spektrallinien hängt somit von der Verstärkung der einfallenden sowie der

inelastisch gestreuten Strahlung ab, woraus sich folgender Zusammenhang ergibt: $I_{SERS} = |E_{loc}(\omega_0)|^2 |E_{loc}(\omega_0 \pm \omega_{vib})|^2$, welcher oftmals durch Einführung der Näherung $\omega_0 \approx \omega_0 \pm \omega_{vib}$ zu $I_{SERS} = |E_{loc}(\omega_0)|^4$ vereinfacht wird [23]. Dies ist dadurch gerechtfertigt, dass die Energie molekularer Vibrationen zumeist deutlich kleiner als die Energie des Anregungslichtes ist. Der Beitrag des elektromagnetischen Mechanismus zur Gesamtverstärkung hängt damit von der Verstärkung des lokalen, elektrischen Feldes E_{loc}/E_0 ab, woraus sich der Verstärkungsfaktor zu $G = |E_{loc}(\omega_0)/E_0(\omega_0)|^4$ ergibt.

Die Verstärkung des Nahfeldes liegt für einzelne Nanopartikel im Bereich zwischen 10 und 100, wohingegen im geringen Abstand zueinander angeordnete Nanopartikel Feldverstärkungen von bis zu 10^3 erreichen können [24, 25]. Dies beruht auf der Kopplung der SPP der einzelnen Partikel, was zu extremen Feldüberhöhungen in den kleinen Volumina zwischen den Strukturen, den sogenannten „Hot-Spots“, führt. Mit Hilfe der E^4 -Abhängigkeit kann ebenfalls die räumliche Reichweite der elektromagnetischen Verstärkung für den Fall eines sehr kleinen, kugelförmigen Nanopartikels abgeschätzt werden [20]. Für das elektrische Feld um eine Kugel gilt $E \propto 1/(a+d)^3$, wobei a der Radius der Kugel und d der Abstand eines Moleküls von der Oberfläche dieser ist. Daraus folgt für die SERS-Intensität $I_{SERS} = 1/(a+d)^{12}$. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich für die elektromagnetische Feldverstärkung eine Reichweite von ungefähr 10 nm (von der Metalloberfläche aus gemessen).

Im Gegensatz dazu, erfahren ausschließlich an der Oberfläche adsorbierte Moleküle eine zusätzliche Verstärkung durch den chemischen Mechanismus. Die beiden dominierenden Beiträge hierzu resultieren aus der resonanten Anregung von intramolekularen Dipolübergängen und Ladungsträger-Transferprozessen zwischen Adsorbat und Metall [18, 26]. Der erste der beiden Prozesse ist im Prinzip analog zur Resonanz-Raman-Streuung eines freien Moleküls. Er wird jedoch als Oberflächeneffekt betrachtet, da sich die Wechselwirkung mit dem Metall auf das Dipolübergangsmoment und die Relaxationsrate des angeregten Zustandes auswirkt. Beide Größen haben dabei einen Einfluss auf die Intensität der Raman-Banden. Um eine Signalverstärkung zu erzielen, muss die Verstärkung des Dipolübergangsmomentes größer sein als die der Relaxationsrate [18]. Der zweite Prozess ähnelt ebenfalls dem Resonanz-Raman-Effekt, mit dem Unterschied, dass die einfallende Welle resonant mit einem Ladungsträger-Transfer im neu gebildeten Molekül-Metall-System sein muss. Hinzu kommt ein schwächerer, nicht-resonanter Beitrag, der auf der Relaxation der elektronischen Struktur des Adsorbats in Folge der Wechselwirkung mit der Metalloberfläche beruht und daher als statischer chemischer Mechanismus bezeichnet wird [18, 27].

I. Einleitung

Bei einem direkten Vergleich der Raman- und SERS-Spektren der selben Substanz werden Unterschiede hinsichtlich der Position und der Intensitätsverhältnisse einzelner Banden deutlich. Einen großen Einfluss auf die Intensität der Banden in den SERS-Spektren hat die Orientierung des Moleküls zur Oberfläche, woraus sich die Oberflächenauswahlregeln ableiten [28, 29]. Für den Fall, dass das lokale elektrische Feld senkrecht zur Oberfläche polarisiert ist, erfahren Schwingungs-Banden mit starken Komponenten des Polarisierbarkeitstensors normal zur Oberfläche, eine höhere Verstärkung als jene, deren Tensor starke parallele Komponenten aufweist [30]. Zudem wirkt sich der zweite Anteil der elektromagnetischen Verstärkung, der aus der Wechselwirkung des Raman-gestreuten Lichts mit den SPP folgt [31], sowie die resonanten Beiträge der chemischen Verstärkung unterschiedlich stark auf einzelne Banden aus. Der nicht-resonante Beitrag beeinflusst zusätzlich zur Intensität auch die Position der Raman-Banden, da hier eine Veränderung der elektronischen Struktur des Moleküls stattfindet. Eine weitere Besonderheit stellt der sogenannte Feldgradienten-Effekt dar [29, 32]. Das Auftreten dipol-verbotener Schwingungs-Anregungen in den SERS-Spektren wird hier als Folge von Multipol-Übergängen erklärt, welche aufgrund des hohen Gradienten des evaneszenten Nahfeldes über das Molekül hinweg an Bedeutung gewinnen.

Zur Optimierung der Gesamtverstärkung müssen Molekül, Anregungsquelle sowie das verwendete SERS-Substrat aufeinander abgestimmt werden, wobei der Analyt im Allgemeinen bereits durch die geplante Anwendung festgelegt ist. Wird die Wellenlänge des Anregungslichts auf die Absorptionsbanden des Moleküls abgestimmt, kann zusätzlich die Resonanz-Verstärkung ausgenutzt werden. In diesem Fall wird von oberflächenverstärkter Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS; engl.: *Surface enhanced resonance Raman spectroscopy*) gesprochen. Viele analytisch relevante Substanzen sind jedoch farblos und absorbieren somit im ultravioletten Spektralbereich. Die Anwendung von UV-SERS ist vor allem dadurch beschränkt, geeignete Substratmaterialien zu finden [22]. Einige Vertreter der Übergangsmetalle, wie Platin oder Ruthenium, eignen sich prinzipiell für plasmonische Anwendungen im UV-Bereich, weisen jedoch deutlich geringere Verstärkungsfaktoren als Silber und Gold bei sichtbaren Wellenlängen auf. Hinzu kommen Herausforderungen, die durch die erhöhte Photodegradation von Molekülen und die geringere Effizienz von optischen Bauelementen für den UV-Bereich bedingt sind.

Ein weiteres Kriterium für die Wahl der Anregungswellenlänge stellt das verwendete Substrat dar, da nicht jede Struktur über den gesamten sichtbaren Spektralbereich hinweg angepasst werden kann. Grundsätzlich können SERS-Substrate in zwei Gruppen unterteilt werden, Nanopartikel in kolloidaler Lösung und planare Nano-

strukturen. Das ideale SERS-Substrat zeichnet sich dadurch aus, dass es eine hohe Sensitivität mit wiederholbaren Ergebnissen für eine Vielzahl verschiedener Analyten, und damit Anwendungen, vereint [33, 34]. Dies setzt eine hohe, gleichmäßige Signalverstärkung voraus. Im Fall planarer Strukturen sollte die Verstärkung daher über große Flächen möglichst gering variieren, was eine hohe Regelmäßigkeit der Strukturen voraussetzt. Vergleichbare Kriterien für Kolloide sind eine schmale Größenverteilung sowie niedrige Variationen bezüglich der Geometrie. Weiterhin ist ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit, vor allem für den Vergleich zeitlich oder räumlich voneinander getrennt durchgeführter Messungen, vonnöten. Zusätzlich sind praktische Gesichtspunkte, wie Langzeitstabilität, geringer Präparationsaufwand und Kosteneffizienz, von großer Bedeutung.

Daraus ergeben sich wesentliche Herausforderungen, die für den Einsatz der SERS-Spektroskopie für analytische Anwendungen adressiert werden müssen. Hinzu kommt eine weitere Problematik, welche alle chemischen Analyseverfahren betrifft, die Untersuchung einer einzelnen oder mehrerer Substanzen in einem komplexen Stoffgemisch, das für gewöhnlich als Probenmatrix bezeichnet wird. Die gemessenen SERS-Spektren setzen sich aus Beiträgen aller Raman-aktiven Matrixbestandteile und Analytmoleküle zusammen, die sich im geringem Abstand zur Substratoberfläche befinden. Deshalb überlagern spektrale Beiträge der Probenmatrix oft die Banden der Analyten, was eine Detektion und vor allem die Quantifizierung dieser erheblich erschwert. Aus diesen Gründen hat sich die Forschung auf dem Gebiet der SERS-Spektroskopie in den letzten Jahren vor allem auf die Erhöhung der Stabilität der Technik sowie den Umgang mit komplexeren Probenmatrices beschäftigt.

Die Robustheit hängt dabei nicht alleinig von den bereits erwähnten experimentellen Faktoren ab, sondern ebenfalls von den angewendeten Verfahren zur Datenaufbereitung und -analyse. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist hierbei die Automatisierung der Datenauswertung, da auf diese Weise subjektive Einflüsse auf die Ergebnisse minimiert werden können. Gleichzeitig wird dadurch die Auswertung großer Datensätze oft erst ermöglicht sowie deutlich beschleunigt. Zudem trägt der Einsatz von Methoden der multivariaten Statistik entscheidend zur Adressierung der Problematik von Mischspektren aus Analyt- und Matrixbestandteilen bei. Auf Basis jener Algorithmen können wertvolle Informationen aus den Daten extrahiert werden, die auf andere Weise nicht zugänglich wären und auf deren Basis eine Detektion bzw. Quantifikation möglich wird.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über ausgewählte experimentelle Ansätze und chemometrische Methoden gegeben werden, die zu einer Verbesserung analytischer Verfahren auf der Grundlage der SERS-Spektroskopie beitragen können. Dabei

I. Einleitung

stehen zunächst die experimentellen Faktoren, wie die Stabilität der Substrate und der Messbedingungen, im Vordergrund. Daran anschließend werden häufig verwendete Techniken für eine automatisierbare Datenvorbehandlung und Methoden zur Analyse von Mischspektren vorgestellt.

2.2.2. Experimentelle Ansätze

Edelmetallkolloide lassen sich einfach und kostengünstig herstellen und gehören daher, nach wie vor, zu den am häufigsten eingesetzten SERS-Substraten [35, 36]. Ihre Präparation erfolgt für gewöhnlich durch die chemische Reduktion von Silber- oder Gold-Ionen aus Lösungen entsprechender Salze [37]. Einzelne, kugelförmige Nanopartikel weisen im Allgemeinen eine geringe Feldverstärkung auf und sind daher für SERS-Anwendungen ungeeignet [38]. Dimere sowie größere Agglomerate dieser, zählen jedoch aufgrund der Ausbildung von *Hot-Spots* in den Zwischenräumen der Partikel, zu den Substraten mit den höchsten Verstärkungsfaktoren. Ausgelöst durch die Zugabe eines Aggregierungsmittels, oft Alkalihalogenide, oder durch das Analytmolekül selbst, findet die Agglomeration auf Zeitskalen von mehreren Sekunden bis einigen Minuten statt. Die Zeitspanne zwischen Start der Agglomeration und Messung sollte dabei möglichst konstant gehalten werden, um die Wiederholbarkeit der Messungen nicht negativ zu beeinträchtigen. Dies lässt sich durch den Einsatz von Küvetten nur bedingt realisieren. Eine weitere Herausforderung stellt eine konstante Durchmischung von Probe- und Kolloidlösung sowie dem Aggregierungsmittel dar.

Die Verwendung eines Mikrofluidik-Chips als Plattform für SERS-Messungen, oft als LoC-SERS (engl.: *Lab-on-a-Chip-SERS*) oder optofluidisches System bezeichnet, bietet deutliche Vorteile hinsichtlich der Kontrolle dieser experimentellen Parameter. Computergesteuerte Spritzenpumpensysteme ermöglichen eine präzise Steuerung der Flussraten und durch eine gezielte Anpassung der Kanallänge bzw. die Auswahl des Messpunktes auf dem Chip kann die Zeit zwischen Zusammenführung von Analyt, Kolloid und gegebenenfalls Aggregierungsmittel und Start der Messung konstant gehalten werden. Zusätzlich sorgen mäanderförmige Kanalstrukturen für eine gleichmäßige Durchmischung der einzelnen Lösungen und der hohe Grad der Automatisierung reduziert die Anzahl subjektiver Fehlerquellen.

Weitere Vorteile bietet das Konzept des sogenannten segmentierten Flusses [39, 40]. Dabei werden in einem durch den Kanal fließenden, hydrophoben Medium, zumeist Mineralöl, wässrige Tropfen mit Hilfe eines seitlichen Kanalzuganges erzeugt. Die Wände der Kanäle sind zudem mit einer hydrophoben Schicht funktionalisiert, was dazu führt, dass die Tropfen keinen Kontakt mit der Kanalwand haben. Dies reduziert das Auftreten des sogenannten „*Memory*“-Effektes, der Anreicherung von

Molekülen an der Kanalinnenwand und der damit verbundenen Verfälschung der Messergebnisse. Weitere Eingänge ermöglichen die präzise Zugabe unterschiedlicher Lösungen in die sich bewegenden Tropfen, welche somit als voneinander unabhängige „Experimentiervolumina“ angesehen werden können. Auf diese Weise lassen sich nach erfolgter Befüllung der Spritzen automatisiert Tropfenkolonnen mit beliebig wählbaren Konzentrationsprofilen erstellen und vermessen. Dies ermöglicht die Durchführung einer großen Zahl an Replikatmessungen in kurzer Zeit. Durch die versetzte Position der einzelnen Seitenzugänge kann zudem die Reihenfolge der Zugabe einzelner Lösungen gewählt werden, was in Abhängigkeit des Analytes oder der Probenmatrix eine große Rolle für das Experiment spielen kann [41]. Weiterhin verhindert das geringe Volumen der Tropfen, das nur wenige hundert Nanoliter beträgt, die Bildung zu großer Agglomerate. Deren Bildung stellt in Chips mit kontinuierlichem Fluss mitunter ein Problem dar, da sie im Ausgangsbereich des Kanals sedimentieren und diesen dabei verstopfen können.

Eine weitere Problematik, hinsichtlich der Signalstabilität, ist die geringe Vergleichbarkeit der Nanopartikel verschiedener Chargen. Einerseits weichen die absoluten Intensitätswerte mehrerer frisch hergestellter Chargen häufig voneinander ab, andererseits unterscheiden sich die Chargen hinsichtlich der Alterung der Partikel. Indem die Partikelsynthese direkt im Chip durchgeführt wird, lassen sich auch hier positive Effekte durch den Einsatz der LoC-SERS-Technik erzielen [42, 43]. Die automatisierte Präparation unter besser kontrollierbaren Bedingungen gewährleistet eine erhöhte Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Chargen. Zudem kann die Alterungsproblematik der Partikel auf diese Weise umgangen werden. Weitere Vorteile sind der geringere Einsatz an Chemikalien und die Tatsache, dass auf zusätzliches Laborequipment sowie spezialisiertes Personal verzichtet werden kann.

Die Agglomeration der Nanopartikel selbst ist jedoch ein rein zufälliger Prozess, weshalb Intensitätsschwankungen allein durch die Herstellung konstanterer Bedingungen für die Partikelsynthese sowie die Messungen nicht vermieden werden können. Hinzu kommen die Größenverteilung der Nanopartikel, welche nicht beliebig verringert werden kann, die Bewegung der Agglomerate relativ zum Fokusvolumen und, nicht zuletzt, Schwankungen durch die Messapparatur selbst und sich ändernder Umgebungsbedingungen. Aus diesen Gründen erscheint die Einführung eines Standards zur Normierung der gemessenen Signale naheliegend.

Eine in der Schwingungsspektroskopie gängige Methode, welche für SERS-basierte Analysen adaptiert werden kann, ist die Zugabe isotoopenmarkierter Analytmoleküle, deren Konzentration in allen Messungen konstant gehalten wird [44–47]. Da die Schwingungsfrequenz von der Masse der daran beteiligten Atome abhängig ist, be-

I. Einleitung

wirkt eine Änderung dieser eine Verschiebung der zugehörigen Banden im Spektrum. Dank der geringen Linienbreite typischer IR- oder Raman-Banden können Standard- und Analytsignal einfach voneinander getrennt werden und das Verhältnis der Intensitäten beider Signale, anstelle der absoluten Signalintensität der Bande, genutzt werden. Die chemischen Eigenschaften des Standards bleiben dabei nahezu unverändert, wodurch die Wechselwirkung mit der Metalloberfläche nur unwesentlich beeinflusst wird. Der Aufwand zur Herstellung isotopenmarkierter Moleküle und die damit verbundenen Kosten sind jedoch hoch, weshalb auf die Zugabe anderer, in der Regel chemisch ähnlicher, Moleküle zurückgegriffen werden kann [48–50]. Die Konkurrenzsituation zwischen Standard- und Analytmolekülen an der Metalloberfläche, die eine allgemeine Problematik bei der Zugabe von Standardmolekülen in SERS-Experimenten darstellt, bleibt dabei allerdings bestehen. Je nach Konzentration des Analyten wird die Anbindung der Standardmoleküle beeinflusst und damit auch die gemessene Signalintensität ihrer Banden. Eine Möglichkeit dies zu verhindern stellen Nanopartikel mit integriertem Standard dar. Hierfür eignen sich besonders sogenannte *Core-Shell*-Nanopartikel, bimetallische Partikel, deren Hülle aus einem anderen Material als der Kern besteht [51–54]. Die Standardmoleküle binden nach der Partikelsynthese an der Oberfläche dieser und werden anschließend von einer weiteren Metallschicht umhüllt. Auf diese Weise treten Standard und Analyt an der Oberfläche nicht in Konkurrenz.

Ein anderes Konzept zur Standardisierung gemessener Signale bietet die LoC-SERS-Technik mit segmentiertem Fluss [55]. Über die Ansteuerung der Spritzenpumpen lassen sich abwechselnd Tropfenkolonnen mit der zu untersuchenden Probelösung und einer Standardlösung erzeugen. Die Standardlösung enthält dabei den selben Analyten wie die Probelösung. Zur Normalisierung kann die Fläche einer typischen Analytbande herangezogen werden. Dabei wird jedes Probenspektrum durch den Mittelwert der Bandenflächen der zuvor und danach gemessenen Konzentrationsstufe des Standards geteilt. Auf diese Weise lassen sich zwar ausschließlich Schwankungen des Messaufbaus sowie der Umgebungsbedingungen reduzieren, allerdings können einfache Edelmetallkolloide zum Einsatz gebracht werden, wodurch sich zusätzliche Syntheseschritte zur Aufbringung und Verkapselung des Standards erübrigen. Zudem besteht durch die zeitliche Trennung der Analyt- und Standardmessungen keine Konkurrenzproblematik an der Oberfläche der Metallpartikel.

Grundsätzlich eignen sich metallische Nanopartikel in wässriger Lösung nicht zur Detektion wasserunlöslicher Substanzen, was zunächst einen Nachteil darstellt. Ihr Einsatz ist jedoch nicht nur auf Anwendungen in wässrigen Lösungen beschränkt. So können planare SERS-Substrate durch das Aufbringen beliebig geformter Na-

nopartikel sowie von Agglomeraten auf einem Trägermaterial, wie Silizium- oder Quarzglas, hergestellt werden [56]. Ein einfaches Verfahren ist die Ausnutzung von Selbstorganisationsprozessen an Phasengrenzen zwischen Flüssigkeiten und Gasen sowie zweier nicht mischbarer Flüssigkeiten. Die geordneten Partikel werden daraufhin, beispielsweise durch das sogenannte Langmuir-Blodgett-Verfahren [57], auf das Substrat übertragen. Ein verwandtes Verfahren findet bei der Herstellung sogenannter FON-Substrate (engl.: *Film over nanosphere*) Anwendung. Hierbei werden zunächst nach dem selben Prinzip nichtmetallische, sphärische Partikel auf ein Substrat aufgebracht, welche anschließend mit einer dünnen Schicht Silber bedampft werden [56]. Beide Strukturen können relativ einfach präpariert werden und weisen eine hohe Flächendichte an *Hot-Spots* auf. Allerdings führen unvermeidbare Fehlstellen in den Nanopartikelfilmen zu einer Erhöhung der Unordnung dieser und somit zu Schwankungen der gemessenen Intensität.

Neben diesen Ansätzen wurden in den vergangenen Jahren eine Vielzahl weiterer Fertigungstechniken zur Herstellung planarer SERS-Substrate entwickelt. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der Reproduzierbarkeit der Strukturen sowie der Homogenität der gemessenen Signale. Grundsätzlich lassen sich zwei Strategien unterscheiden, welche als *Top-Down*- und *Bottom-Up*-Verfahren bezeichnet werden [56, 58]. Im Gegensatz zu den *Bottom-Up*-Verfahren, bei denen Nanostrukturen durch die Ausnutzung von Selbstorganisations- oder Wachstumsprozessen erzeugt werden, beruhen *Top-Down*-Verfahren auf Techniken der Nanofabrikation, deren bekannteste Vertreter die Elektronenstrahlolithografie und das direkte Ionenstrahlschreiben sind. Während mit Hilfe eines Ionenstrahles direkt Strukturen in eine zuvor aufgebrachte Metallschicht eingeschrieben werden können, dient der Elektronenstrahl zur Strukturierung eines zusätzlich auf der Metallschicht aufgetragenen Polymerfilms. Dieser wird anschließend entwickelt und dient als Maske für trocken- oder nasschemische Ätzprozesse. Alternativ kann zur Herstellung einer Ätzmaske auch ein Ionenstrahl oder Licht im extremen ultravioletten Bereich (ca. 10 – 100 nm) verwendet werden. *Top-Down*-Verfahren ermöglichen die Herstellung äußerst regelmäßiger Strukturen über mehrere Quadratmillimeter hinweg und bieten dabei ein hohes Maß an Freiheit bezüglich deren Geometrie. Allerdings sind die erwähnten Herstellungsverfahren sehr aufwendig und kostenintensiv, weshalb erst die Produktion mittels Techniken wie der Nanoprägelithografie in großen Stückzahlen wirtschaftlich rentabel ist. Dabei wird die Struktur eines nanolithografisch hergestellten Stempels in ein Positivmaterial überführt. Hier bieten mittels *Bottom-Up*-Verfahren präparierte Substrate Vorteile. Zwar sind die Strukturen oft hinsichtlich ihrer Re-

I. Einleitung

gelmäßigkeit unterlegen, allerdings ist die Herstellung deutlich kostengünstiger und kann, in einigen Fällen, ohne aufwendiges Laborequipment realisiert werden.

Ein einfacher Ansatz zur Erhöhung der Stabilität der Messergebnisse ist das Abrastern des Substrates während der Messung. Dadurch wird über Bereiche mit geringer und hoher Verstärkung gemittelt und gleichzeitig der Einfluss der Photodegradation verringert. Abweichungen von Substrat zu Substrat, Instabilitäten des Messaufbaus und sich ändernde Umgebungsbedingungen lassen sich jedoch, auch im Fall planarer Substrate, nur durch die Einführung eines Standards erfassen. Trägt das Substratmaterial selbst zum Raman-Spektrum bei, so kann eine spezifische Bande des Substrates als Standard verwendet werden [59–61]. Silizium weist beispielsweise eine Phononen-Bande bei 520 cm^{-1} auf, welche zur Normalisierung der Spektren herangezogen werden kann. Allerdings erfährt das Signal des Substrates nicht notwendigerweise eine Verstärkung durch den SERS-Mechanismus, weshalb Schwankungen durch Abweichungen der Strukturen selbst nicht mit erfasst werden. Die Verwendung der Raman-Signale einer selbstorganisierten Monoschicht zur Standardisierung der Signalintensität stellt eine weitere Option für planare Strukturen dar [57, 62]. Allerdings wirkt sich der vergrößerte Abstand zwischen Analyt und Metalloberfläche, bedingt durch die Dicke der Monoschicht, negativ auf die Signalverstärkung aus. Zudem verhindert die Schicht eine direkte Anbindung von Molekülen an der Oberfläche.

Daraus ergeben sich jedoch nicht nur Nachteile, da Monolagen bestimmter Moleküle gezielt zur Anreicherung oder Anbindung des Analyten genutzt werden können [33]. Auf diese Weise kann im Vergleich zum einfachen Eintrocknen der Probelösung auf der Nanostruktur eine gleichmäßigere Verteilung des Analyten erzielt werden. Außerdem können durch eine derartige Modifizierung des SERS-Substrates Moleküle, welche nicht an die Metalloberfläche binden, in deren Nähe gelangen und dort nachgewiesen werden. Ein Beispiel hierfür sind klinisch relevante Zucker. Schichten einer Mischung aus Decanthiol und Mercaptohexanol ermöglichen die reversible Anbindung und Detektion von Glukose [63, 64] und Lactat [65]. Eine zusätzliche Erhöhung der Selektivität für Glukose kann mit Molekülen erreicht werden, die zwei freie Boronsäuregruppen aufweisen [66]. Im Gegensatz dazu bindet an Molekülen mit nur einer Boronsäuregruppe vorwiegend Fructose, ein Umstand, der ebenfalls für Sensoranwendungen ausgenutzt werden kann [67, 68]. Weitere Beispiele für die Anwendung funktioneller Monolagen für die SERS-Analytik sind die Detektion von Benzen, Ethylbenzen, Toluol und Xylen in flüssiger [69] und gasförmiger [70] Phase auf Basis einer Propanthiol-Schicht sowie des Umweltschadstoffes Pentachlorphenol durch eine Modifizierung der Metalloberfläche mit Cysteamin [71]. Gleichzeitig

tragen die Schichten zum Schutz der Nanostrukturen gegen Umwelteinflüsse und Alterungsprozesse bei und die selektive Bindung bewirkt eine Reduzierung der Matrixeinflüsse.

Trotzdem sind die Analytbanden in der Regel mit dem Untergrundsignal der Matrix überlagert. Dies führt bei vielen Anwendungen dazu, dass sich die Spektren der reinen Matrix sowie der Matrix mit Analyt nur geringfügig unterscheiden, was die Detektion sowie die Quantifizierung einer Substanz erschwert. Dies stellt einen der Gründe dar, warum die multivariate Statistik zunehmend Verwendung in SERS-basierten Untersuchungen findet.

2.2.3. Chemometrische Ansätze

Multivariate Klassifikations- und Kalibriermodelle sind in der Lage Informationen aus komplexen Mischspektren zu extrahieren, welche mittels anderer Methoden nicht zugänglich sind. Allerdings wird ihre Zuverlässigkeit zunächst dadurch eingeschränkt, dass die gemessenen Raman- oder SERS-Spektren nicht ausschließlich die Informationen des inelastisch gestreuten Lichts tragen, sondern auch zusätzliche Beiträge anderer Effekte sowie der Messapparatur selbst [72]. Hierzu zählen das Gauß-verteilte Rauschen unkorrelierter Prozesse, das sogenannte „weiße Rauschen“, sowie weitere Rauschprozesse, die von den einzelnen technischen Komponenten des Aufbaus ausgehen. Beispiele dafür sind das Dunkelrauschen des Detektors, das Ausleserauschen der Elektronik sowie das Flicker-Rauschen des Lasers [73]. Ein weiterer Störeffekt, der sich für gewöhnlich über den gesamten, gemessenen Spektralbereich erstreckt, ist das Untergrundsignal, hervorgerufen durch die Fluoreszenz vieler Probenbestandteile und die Basislinie des Sensors. Hinzu kommen die sogenannten kosmischen „*Spikes*“, bei welchen es sich extrem schmalbandige Beiträge handelt, die durch hochenergetische Partikel, die auf die spektrale Kamera auftreffen, verursacht werden. Dies verdeutlicht, dass die Vorbehandlung spektroskopischer Daten, zur Abspaltung der zuvor genannten Effekte, eine wichtige Grundlage für eine erfolgreiche Analyse darstellt.

Zur Behandlung des Untergrundsignals steht eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Verfügung [72, 74]. Der konzeptionell einfachste Ansatz stellt das Anpassen eines Polynoms an die Kurve dar. Auf diese Weise lassen sich insbesondere spektral breite Beiträge zufriedenstellend entfernen. Allerdings neigen gerade Polynome höherer Ordnung dazu, Anteile der Banden mit anzupassen, wodurch ein gewisser Teil des eigentlichen Spektrums mit kompensiert wird. Dies stellt besonders bei schwachen, sich einander überlappenden Banden ein Problem dar. Eine Alternative zur Abschätzung des Untergrundsignals bietet der sogenannte SNIP-Algorithmus

I. Einleitung

(engl.: *Statistics-sensitive non-linear iterative peak-clipping*) [75]. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus Glättungsfilter und *Peak-Clipping*-Algorithmus. Der Filter arbeitet mit einem breiten Glättungsfenster, wodurch vor allem Bereiche mit geringem Informationsgehalt erfasst werden. Im Gegensatz dazu werden beim *Peak-Clipping* die Positionen der Banden lokalisiert, damit diese nicht dem Untergrund zugeordnet werden. Zurück bleibt die Abschätzung des spektralen Untergrundsignals, welche vom Spektrum abgezogen wird. Neben diesen Methoden zur Anpassung des Untergrundes existieren weitere Ansätze, die auf der Bildung der ersten oder zweiten Ableitung sowie verschiedener Transformationsmethoden, wie der Fourier- oder *Wavelet*-Transformation, beruhen [74]. Zusätzlich können diese oder verwandte Methoden zur Unterdrückung des unkorrelierten Rauschens in den Spektren eingesetzt werden. Ein oft genutztes Beispiel ist der Savitzky-Golay-Algorithmus.

Bei kosmischen *Spikes* handelt es sich ihrem Ursprung nach um rein zufällig auftretende, kurzzeitige Ereignisse, die oft nur einen einzelnen spektralen Kanal betreffen. Aufgrund der hohen Energie der auftreffenden Teilchen weist der betroffene Kanal jedoch hohe Intensitätswerte bis hin zur Sättigung auf. Diese Charakteristik kann ausgenutzt werden, um kosmische *Spikes* auf der Basis von Wiederholungsmessungen zu identifizieren [75]. Der gesuchte *Spike* tritt in der Regel in nur einem Spektrum der Zeitreihe auf. Demnach kann er als Ausreißer detektiert werden, wenn für jeden einzelnen spektralen Kanal die zeitliche Entwicklung der Intensität betrachtet wird. Zusätzlich kann, um Fehlentscheidungen zu minimieren, die Entwicklung benachbarter Kanäle mit eingeschlossen werden. Für das Auffinden von Ausreißern in Daten gibt es verschiedene Ansätze [76]. Eine einfache Methode ist die Ausnutzung der Definition über den Interquartilabstand³, wonach ein Ausreißer vorliegt, wenn der Wert nicht im Intervall $[Q_{0,25} - k \cdot IQR; Q_{0,75} + k \cdot IQR]$ mit $IQR = Q_{0,75} - Q_{0,25}$ liegt. Dabei sind IQR der Interquartilabstand und $Q_{0,25}$ sowie $Q_{0,75}$ das untere sowie obere Quartil. Typische Werte für den Faktor k sind 1,5 und 3, wobei man von milden und extremen Ausreißern spricht.

Zur Kompensation instabiler Messbedingungen und der damit verbundenen Intensitätsschwankungen können die Spektren zusätzlich skaliert werden. Enthalten die Spektren separierte Banden, welche als Intensitätsstandard geeignet sind, kann das gesamte Spektrum auf das Maximum oder die Fläche jener normiert werden [72, 75]. Ist dies nicht der Fall, kann auf ein allgemeineres Verfahren zurückgegriffen

³Quartile (lat. „Viertelwerte“; streng genommen empirische Quartile) sind Kennzahlen aus der Statistik, die eine geordnete Datenreihe (Stichprobe) in vier (annähernd) gleich große Abschnitte unterteilen. Sie sind die Spezialfälle der p -Quantile für die Werte $p = [0, 25; 0, 5; 0, 75]$. In einer anschaulichen Darstellung handelt es sich um Schwellwerte, wobei $100 \cdot p$ Prozent aller Werte der Datenreihe auf der linken Seite und die übrigen $100 \cdot (1 - p)$ Prozent auf der rechten Seite des entsprechenden p -Quantils liegen.

werden, der Normierung auf die sogenannte p-Norm:

$$\|s\|_p = \left(\sum_{i=1}^n s_i^p \right)^{1/p},$$

wobei p eine positive Zahl, s das Spektrum und i der Index des spektralen Kanals sind. Zwei häufig genutzte Fälle sind die euklidische Norm ($p = 2$) und die Maximumsnorm ($p \rightarrow \infty$). In einigen Fällen erweisen sich auch andere Normen, wie beispielsweise die Min-Max-Norm, als praktikabel.

Die so vorbehandelten Spektren können nun für die eigentlich geplante Analyse verwendet werden. Die gängigste Methode zur Quantifizierung einer oder mehrerer Substanzen in einer unbekannten Probe beruht auf einem zweistufigen Verfahren. Zunächst wird eine Kalibrierung, basierend auf Lösungen mit bekannter Analytkonzentration, durchgeführt. Anschließend wird die unbekannte Probe gemessen und mit Hilfe der Kalibrierung lassen sich die Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen vorhersagen. Die zentrale Problemstellung ist somit die Suche nach einem Modell $\mathbf{Y} = f(\mathbf{X})$, welches anhand eines Datensatzes aus Messgrößen \mathbf{X} , der sogenannten unabhängigen Variablen, die Vorhersage der abhängigen Variablen \mathbf{Y} , also der gesuchten Messgrößen, wie beispielsweise der Konzentration, erlaubt [77]. Die gemessenen Spektren sind dabei in den Zeilen der Matrix \mathbf{X} angeordnet und die Matrix \mathbf{Y} enthält ihren Spalten die Werte für die abhängigen Variablen. Gleichzeitig ist die Abschätzung des Fehlers, der bei der Vorhersage zu erwarten ist, von großer Bedeutung. Im Folgenden soll Allgemein von einer linearen Abhängigkeit zwischen den unabhängigen und abhängigen Variablen ausgegangen werden.

Die multiple lineare Regression (MLR) ist ein grundlegendes Verfahren zur Erzeugung eines linearen Modells. Ziel ist es die Matrix der Regressionskoeffizienten \mathbf{B} für den Zusammenhang $\mathbf{Y} = \mathbf{XB} + \mathbf{E}$ zu finden, wobei \mathbf{E} die Residuen enthält. Dies lässt sich mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate realisieren, auf deren Basis sich die Regressionskoeffizienten zu $\mathbf{B} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y}$ ergeben. Zwei wesentliche Nachteile beschränken jedoch den Einsatz dieser Methode. Überschreitet die Anzahl der unabhängigen Variablen die Zahl der Proben, so lassen sich unendlich viele Lösungen für die Regressionsparameter finden, die die Gleichung des Problems erfüllen [78]. Somit kann die Inverse der Matrix $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$ nicht berechnet werden. Die zweite Einschränkung ist die hohe Empfindlichkeit der Modelle bezüglich Korrelationen in den unabhängigen Variablen [77]. Dies führt zu einer hohen Varianz der Regressionsparameter und damit zu instabilen Modellen, deren Vorhersagen eine geringe Zuverlässigkeit aufweisen.

I. Einleitung

In spektroskopischen Anwendungen übersteigt die Zahl der spektralen Kanäle oft die der gemessenen Proben und die Korrelation der Signale zwischen benachbarten Kanälen ist hoch. Daher müssen Verfahren zum Einsatz kommen, welche die Anzahl der unabhängigen Variablen oder deren Korrelation zueinander reduziert. Ein einfacher Weg ist die Verwendung der Fläche spezifischer Analytbanden anstatt der gesamten spektralen Information. Dies setzt jedoch voraus, dass die Analytbanden nicht bzw. kaum mit dem Untergrundsignal der Probenmatrix überlagert sind. In vielen Fällen ergibt sich daraus die Notwendigkeit Methoden der multivariaten Statistik zur Reduktion der Dimensionalität des Problems einzusetzen.

Ein häufig genutztes Konzept zur Dimensionsreduktion stellt die PCA dar. Hierbei werden neue, aufeinander orthogonal stehende Variablen als Linearkombinationen der unabhängigen Variablen erzeugt, sodass die Erste die höchste Varianz der Daten enthält [79]. Alle folgenden Variablen weisen jeweils die nächste höchstmögliche Varianz auf. Zur Berechnung dieser, auch als Hauptkomponenten bezeichneten, latenten Variablen, findet eine Matrixzerlegung $\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T$ statt, die als Rotation des Koordinatensystems verstanden werden kann. Die Matrizen \mathbf{T} und \mathbf{P} enthalten in ihren Spalten die sogenannten *Scores* und *Loadings*. Die *Scores* sind dabei die Koordinaten der Datenpunkte im neuen Raum der latenten Variablen und die *Loadings* bilden die neuen Koordinatenachsen. In den meisten Fällen beinhaltet bereits eine geringe Anzahl an Hauptkomponenten den überwiegenden Anteil der Varianz des Datensatzes. Die Varianz lässt sich dabei als die gesuchte Information interpretieren. Folglich können die restlichen latenten Variablen, welche oft nur Signalrauschen enthalten, für die Modellbildung weggelassen werden, wodurch gleichzeitig eine Reduktion des Rauschens bewirkt wird [78].

Der Grundgedanke der PCA wird in der sogenannten Hauptkomponentenregression (PCR; engl.: *Principal component regression*) aufgegriffen. Hierbei wird eine Regression auf Basis der zuvor ausgewählten *Scores* durchgeführt [77]. Somit lässt sich die Gleichung für die MLR zu $\mathbf{Y} = \mathbf{T}\mathbf{B} + \mathbf{E}$ mit $\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{P}$ umformulieren. Zusätzlich zur Dimensionsreduktion wird auf diese Weise die Problematik der Korrelation benachbarter spektraler Kanäle umgangen, da anstelle jener die orthogonalen Hauptkomponenten genutzt werden. Allerdings liefern die Hauptkomponenten, welche die höchste Variation der ursprünglichen unabhängigen Variablen beinhalten, nicht zwangsläufig die besten Vorhersagen für die abhängigen Variablen. Aus diesem Grund werden die abhängigen Variablen in der PLSR mit in die Berechnung der latenten Variablen einbezogen. Dabei wird das Ziel verfolgt einen Großteil der Varianz beider Matrizen zu erfassen und gleichzeitig die Korrelation zwischen den Matrizen zu maximieren [77].

Ein weiteres chemometrisches Verfahren, das zur Erstellung eines Kalibriermodells auf Basis kompletter spektraler Datensätze verwendet werden kann, ist die MCR. Das Ziel dieser Technik ist die Zerlegung der spektralen Daten in die Einzelbeiträge der Substanzen, die das Stoffgemisch ausmachen [80]. Dies geschieht basierend auf der Annahme, dass sich die gemessenen Spektren additiv aus den Beiträgen der reinen Substanzen zusammensetzen. Hierzu wird die Messdatenmatrix \mathbf{X} in ein bilineares Modell zerlegt: $\mathbf{X} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E}$, wobei die Matrix \mathbf{E} die Residuen enthält. Die Spalten der Matrix \mathbf{S} beinhalten die Spektren der einzelnen Komponenten, die durch das Modell geschätzt werden, und \mathbf{C} ist die Matrix der zugehörigen Konzentrationsprofile. Dabei beinhaltet jede Spalte von \mathbf{C} das Konzentrationsprofil einer der Komponenten.

Häufig wird für die Zerlegung der Messdatenmatrix auf iterative Methoden, wie dem Algorithmus der alternierenden kleinsten Quadrate (ALS; engl.: *Alternating least squares*), zurückgegriffen. Zur Ausführung des ersten Optimierungsschritts sind daher grundsätzlich Startwerte, für mindestens eine der beiden Matrizen \mathbf{C} und \mathbf{S} , vonnöten. Diese können empirisch aus Messdaten oder mit Hilfe chemometrischer Methoden gewonnen werden [81]. Im Fall eines typischen Kalibrierungsproblems sind die Konzentrationswerte sowie die spektralen Beiträge der einzelnen Substanzen, zumindest der Analyten und der Probenmatrix als Ganzes, oft bekannt. Basierend auf diesen Startwerten werden beide Matrizen alternierend solange optimiert, bis ein Abbruchkriterium erreicht worden ist. Dies ist für gewöhnlich der Fall, wenn in zwei aufeinander folgenden Optimierungsschritten die Änderung der Abweichung zwischen den angepassten Kurven und den gemessenen Spektren kleiner als ein zuvor gesetzter Schwellwert ist.

Zusätzlich können durch die Einführung weiterer Bedingungen Ergebnisse vermieden werden, die aus Sicht der Anwendung nicht sinnvoll sind. Hierzu gehört zum Beispiel die Restriktion zur Vermeidung negativer Intensitäts- oder Konzentrationswerte. Die resultierenden Konzentrationsprofile können anschließend als Basis eines einfachen linearen bzw. MLR-Modells genutzt werden. Die Tatsache, dass unter Verwendung der MCR anstelle abstrakter latenter Variablen, chemisch einfach zu interpretierende Größen erhalten werden, stellt aus Sicht des Anwenders einen deutlichen Vorteil dieser Methode dar. Die Notwendigkeit von Startparametern kann allerdings, je nach Problemstellung, ein Nachteil sein. Zudem wird gefordert, dass sich die resultierenden Spektren rein additiv aus den Beiträgen der Komponenten zusammensetzen. Verändern sich beispielsweise die Spektren der einzelnen Substanzen durch die Wechselwirkung mit anderen Matrixbestandteilen, so werden die Ergebnisse negativ beeinflusst.

I. Einleitung

Eine Herausforderung für alle Kalibriermodelle sind Proben, deren Zusammensetzung mit jeder erneuten Probenentnahme variiert. Dies kann eine Veränderung der Untergrundsignale im Vergleich zum Trainingsdatensatz bewirken und auch Einflüsse auf die Analytsignale haben. Die Folgen daraus reichen von ungenaueren Vorhersagen bis hin zum kompletten Versagen des Modells. Eine Möglichkeit dies zumindest teilweise zu umgehen stellt die SAM dar [82]. Hierbei wird gewissermaßen eine Kalibrierung für jede neue Probe durchgeführt, wodurch der Einfluss der variierenden Matrix auf das Analytsignal entfällt. Das prinzipielle Vorgehen ist in Abbildung 1 skizziert und besteht aus den folgenden Schritten. Zunächst wird die Messung der unbekannten Probe, deren Analytkonzentration bestimmt werden soll, durchgeführt. Anschließend wird die Probe künstlich mit einer Standardlösung des Analyten versetzt und erneut gemessen. Dies kann in Form mehrerer Konzentrationsschritte, die hier als Standardadditionsschritte (SAS) bezeichnet werden, oder einer Zweipunktkalibrierung mit mehreren Replikatmessungen geschehen. Die Voraussetzung ist dabei immer, dass die Messparameter, vor allem die Verdünnung der Probe, bei allen Messungen konstant gehalten werden und ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Größe und Konzentration vorliegt. Anhand einer Auftragung der Messgröße über die Konzentrationswerte der SAS kann eine lineare Regression durchgeführt werden. Die Regressionsgerade wird über den Messpunkt der unbekannten Probe hinaus extrapoliert, wobei der Schnittpunkt mit der Abszisse (Konzentrationsachse) den unbekannten Konzentrationswert markiert.

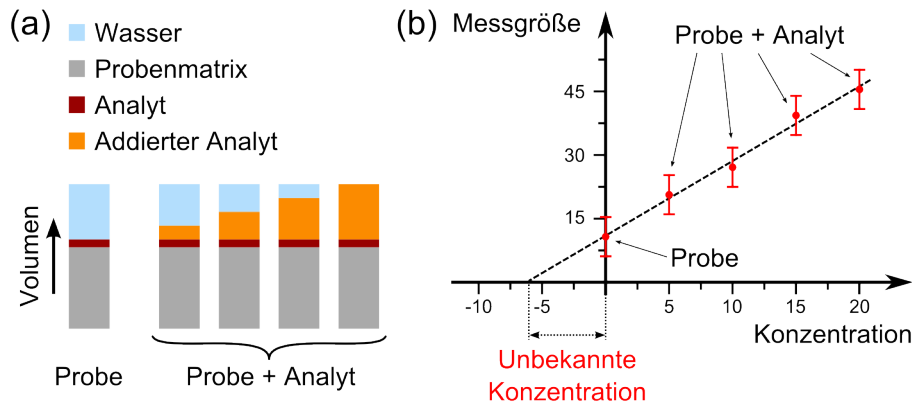


Abbildung 1.: Prinzipielles Vorgehen bei der SAM: (a) Die unbekannte Probe wird unverändert sowie mit zusätzlicher Analytlösung versetzt gemessen. (b) Anschließend wird die Messgröße über die Konzentrationswerte der SAS aufgetragen. Aus der extrapolierten Regressionsgeraden kann die unbekannte Konzentration als Schnittpunkt mit der Abszisse (Konzentrationsachse) bestimmt werden.

Dafür muss die Voraussetzung erfüllt sein, dass bei Fehlen des Analyten in der Probe das gemessene Signal null beträgt. Die SAM eignet sich demnach ausschließlich dazu, sogenannte Rotationseffekte zu korrigieren [82, 83]. Damit sind Änderungen des Analytsignals durch den Einfluss der Matrixbestandteile gemeint. Diese hängen im Allgemeinen von der Konzentration des Analyten ab und bewirken deshalb eine Änderung des Anstieges der Regressionsgeraden, jedoch nicht des Schnittpunktes dieser mit der Abszisse, wenn die Messdaten zweier unabhängig voneinander genommener Proben untereinander verglichen werden. Veränderungen in den Spektren, die durch die Signale der Matrixbestandteile selbst verursacht werden und somit nur das Untergrundsignal beeinflussen, werden hingegen als Translationseffekte bezeichnet. Diese resultieren, im Gegensatz zu den Rotationseffekten, in eine Verschiebung des Schnittpunktes der Regressionsgeraden bei gleichbleibendem Anstieg, weshalb sie durch die SAM nicht korrigiert werden können. Da es bei spektroskopischen Anwendungen zumeist zum Auftreten von Translationseffekten kommt, bedarf es hier zusätzlicher Methoden zur Abschätzung des Untergrundsignals, wie dem bereits vorgestellten SNIP-Algorithmus.

2.3. SERS-basierte Analyse in den Lebenswissenschaften

2.3.1. Lebensmittelsicherheit und Qualitätskontrolle

Verglichen mit dem Goldstandard der Lebensmittelanalytik, den chromatographischen Verfahren, befinden sich SERS-basierte Verfahren noch in einer frühen Entwicklungsphase. In den letzten beiden Jahrzehnten ist die Zahl von Publikationen, die die Einsatzmöglichkeiten der SERS-Spektroskopie zur Untersuchung von Lebensmitteln aufzeigen, jedoch deutlich gestiegen [84]. Der überwiegende Teil dieser Arbeiten konzentriert sich dabei auf die Überwachung von Regularien bei dem Einsatz zugelassener Lebensmittelzusätze sowie der Kontrolle auf unerwünschte Substanzen in Nahrungsmitteln. In geringerem Umfang wird zudem an Methoden zur Qualitätssicherung gearbeitet, wie der Messung des Vitamingehaltes industriell verarbeiteter Produkte [85, 86] oder Untersuchungen auf Pathogene [87–89].

Unter den potentiell gesundheitsschädlichen Substanzen, die während der Erzeugung und Verarbeitung in die Produkte gelangen können, standen vor allem Pestizide und Antibiotika im Fokus der Forschung.[84] Zudem wurde eine Reihe von Stoffen untersucht, welche immer wieder auf illegaler Weise Lebensmitteln zugesetzt werden. Hierzu zählen Melamin, das in bestimmten Produkten einen erhöhten Proteingehalt vortäuscht, sowie bedenkliche Medikamente und Farbstoffe. Beispiele hierfür sind das Antibiotikum Furazolidon sowie der antibakteriell wirkende Farbstoff Malachit-

I. Einleitung

grün, deren Rückstände in Fischprodukten aufgrund ihrer karzinogenen Wirkung ein Gesundheitsrisiko für die Verbraucher darstellen [35, 90]. Weitere in der Lebensmittelindustrie verbotene Farbstoffe, die ebenfalls potentielle Karzinogene darstellen, sind die Sudanfarbstoffe, welche zur Gruppe der Azofarbstoffe gehören. Aufgrund ihrer gelblichen bis rötlichen Farbe kam es immer wieder zu Fällen, in welchen Sudanfarbstoffe zum Nachfärben von Nahrungsmitteln, wie Palmöl, Paprika- oder Chilliprodukten, genutzt wurden [4].

Für den Nachweis von Pestiziden und Antibiotika wurden vorwiegend einfache Silber- und Goldkolloide, in Lösung oder auf einem Substrat abgeschieden, sowie die kommerziell verfügbaren Substrate, Klarite und Q-SERS, verwendet [84]. Im Gegensatz zu Antibiotika, die überwiegend in Form reiner Analytlösungen untersucht wurden, konnten Rückstände ausgewählter Pestizide bereits erfolgreich in Nahrungsmittelproben nachgewiesen werden. Zitratreduzierte Silberpartikel ermöglichten die Detektion von Rückständen jener Substanzen in der Schale diverser Früchte [85, 91, 92], sowie in Teeblättern [93]. In der letztgenannten Studie wurden die Teeblattextrakte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie vor der eigentlichen Messung aufgetrennt. Eine Alternative zur Extraktion konnte anhand von Früchten demonstriert werden. Hierzu wurden die SERS-aktiven Nanopartikel direkt auf die Schale dieser aufgebracht, was eine direkte Messung auf der Probe ermöglicht [85, 94].

Melamin konnte mittels SERS-basierter Verfahren bereits in mehreren komplexen Probematrizes erfolgreich nachgewiesen werden. Neben Milch [95–98], und Eiern [99, 100], wurden vor allem Getreideprodukte [101] sowie pulverförmige Proben [102, 103], beispielsweise Milchpulver oder Säuglingsnahrung, zur Demonstration der Methode herangezogen. Eine Aufreinigung der Extrakte mittels Festphasentrennung auf Basis molekular eingepprägter Polymere (*molecular imprinting*) wurde am Beispiel Milch demonstriert [97]. Wenig später konnte eine derartige Schicht direkt auf die Oberfläche der dendritartigen Silberstrukturen, die als SERS-Substrat genutzt wurden, aufgebracht werden [98]. Dadurch kann ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt vermieden und in die eigentliche Analyse integriert werden.

Molekular eingepprägte Polymere wurden zudem für den Nachweis von Sudanfarbstoffen in Paprikapulver eingesetzt [104]. Die Polymere dienten dabei als stationäre Phase in der Dünnschichtchromatographie. Anschließend wurden Goldkolloide an jene Stellen aufgebracht, an denen sich der Analyt in folge der Auftrennung angereichert hat, wodurch die Polymere gleichzeitig als Substrat genutzt werden können. Die Detektion von Sudan I und Sudan II in Chillipulver konnte ebenfalls über eine Aufreinigung der Extrakte realisiert werden [105]. Hierzu kamen kommerziell verfügbare Trennsäulen für die Festphasenextraktion zum Einsatz. Darüber hinaus konnte

anhand reiner Analytlösungen [106] sowie von Paprikaextrakten [107] gezeigt werden, dass eine parallele Detektion verschiedener Azofarbstoffe mit Hilfe multivariater Methoden möglich ist. Hierbei stand die qualitative Separation der Substanzen, nicht jedoch deren Quantifizierung im Fokus. Allerdings wurde die Anwendbarkeit von PCA- [98] sowie PLSR-Modellen [92, 100, 101, 108] zur Quantifizierung bereits anhand von Melamin und Pestiziden in komplexen Nahrungsmittelproben demonstriert. Hierbei zeigt sich, dass trotz störender Einflüsse der Probenmatrix zufriedenstellende Resultate erzielt werden können.

2.3.2. Überwachung von Medikamenten in Körperflüssigkeiten

SERS-basierende Verfahren zur Überwachung des Medikamentenspiegels müssen nicht nur eine präzise und wiederholbare Quantifizierung einzelner Substanzen in einer komplexen Probenmatrix gewährleisten, sondern auch kostengünstig sein und eine einfache Bedienung ermöglichen. Hierbei spielt auch die Automatisierbarkeit eine große Rolle. Daher wurde in den vergangenen Jahren zusätzlich zur analytischen Fragestellung an Ansätzen gearbeitet, die eine einfache Integration in den klinischen Alltag ermöglichen sollen. Zwei Gruppen von Medikamenten standen in diesen Studien im Fokus der Forschungsarbeit: Chemotherapeutika [109] und Antibiotika [110–113]. Chemotherapeutika weisen oft ein schmales therapeutisches Fenster auf, weshalb eine Überwachung zur Vermeidung einer Unter- bzw. Überdosierung äußerst wichtig ist. Die Wirksamkeit von Antibiotika kann durch die Einnahme anderer Medikamente, gerade bei Patienten auf der Intensivstation, deutlich beeinflusst werden. Daher spielt die Überwachung des Medikamentenspiegels auch hier eine große Rolle.

Die Basis für die meisten Arbeiten stellen Silber- oder Goldnanopartikel in kolloidaler Lösung dar. Durch direktes Mischen von Probe, Kolloid und Aggregierungsmittel konnten die beiden Chemotherapeutika Doxorubicin und Paclitaxel in Rinderblutserum und Humanalbumin [109] sowie verschiedene Antibiotika [111, 113] nachgewiesen werden. Eine präzisere Kontrolle des Mischprozesses kann mit Hilfe einfacher Flusszellen sowie der LoC-SERS-Technik realisiert werden. Durch den Einsatz einer Flusszelle konnte beispielsweise Mitoxantron im Blutserum von Patienten untersucht werden, die mit diesem Medikament behandelt wurden [114]. Weiterhin gelang der indirekte Nachweis des Antibiotikums Erythromycin, über die Detektion eines Fluoreszenzmarkers, in einem mikrofluidischen Chip mit segmentiertem Fluss [110]. Zusätzlich kann die Oberfläche der Nanopartikel, beispielsweise mit β -cyclodextrin oder Graphen, modifiziert werden, um deren Langzeitstabilität und Sensitivität zu erhöhen sowie einen breiteren linearen Bereich zu erhalten [109].

I. Einleitung

Eine andere Strategie ist das Abscheiden metallischer Nanopartikel auf einem Substrat, welches in Katheterschläuchen oder Kanülen integriert wird [109]. Auf diese Weise konnte eine Reihe von Medikamenten in einfachen Analytlösungen sowie künstlichem Urin nachgewiesen werden [115, 116]. Zur Immobilisierung der Partikel kann ebenfalls auf kostengünstige Papiersubstrate zurückgegriffen. Die mittels Tauchbeschichtung (*dip coating*) [117] oder durch Auftropfen [118] hergestellten Substrate, konnten zur Untersuchung des Antibiotikums MTX in Blutserum sowie des Biomarkers Harnsäure im künstlichen Urin verwendet werden. Die Langzeitstabilität von Silberkolloiden, gerade in eingetrockneter Form, ist jedoch gering. Zur Erhöhung der Haltbarkeit der Substrate wurde daher das Einbetten der Partikel in ein Polymer auf Basis eines Celluloseesters vorgeschlagen [119]. Dieses schwillt bei Kontakt mit Flüssigkeit an und ermöglicht so das Eindringen der Probe.

Die hohe Komplexität von Körperflüssigkeiten erfordert oft den Einsatz chemometrischer Methoden, wie PCA- [110] und PLSR-Modellen [120]. Zudem konnte demonstriert werden, dass mit Hilfe eines künstlichen neuronalen Netzwerkes mehrere Substanzen parallel quantifiziert werden können [121]. Die Varianz der Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten verschiedener Patienten sowie des selben Patienten über die Zeit stellt eine zusätzliche Herausforderung für quantitative Untersuchungen dar. Einen möglichen Lösungsansatz für diese Problematik stellt die Verwendung der Standardadditionsmethode in Kombination mit der MCR-ALS [112, 118] sowie der PLS [122] dar. In beiden Fällen dient die multivariate Statistik dazu eine pseudo-univariate Kalibrierung zu ermöglichen. Im Fall der PLS wird die Projektion der ersten latenten Variable und bei der MCR-ALS das iterativ gefundene Konzentrationsprofil des Analyten als abhängige Variable für die lineare Regression genutzt.

3. Eigene Forschungsergebnisse

3.1. Nachweis bedenklicher Farbstoffe in Lebensmittelproben

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Potential der SERS-Spektroskopie für den Nachweis und die Quantifizierung bedenklicher Lebensmittelzusätze am Beispiel der beiden roten Farbstoffe Sudan III, als Vertreter der Sudanfarbstoffe, und Azorubin (auch Karmesin oder E122) untersucht. Der Einsatz von Azorubin ist in der Europäischen Union durch Grenzwerte reglementiert, da der Konsum in größeren Mengen pseudoallergische Reaktionen hervorrufen kann und der Verdacht besteht, dass das Auftreten von Hyperaktivität bei Kindern gefördert wird. Getränke dürfen, je nach Alkoholgehalt, maximal 50 – 200 mg/kg des wasserlöslichen Farbstoffes enthalten. In Kooperation mit der Karls-Universität (Univerzita Karlova) in Prag konnte eine Strategie entwickelt werden, die eine SERS-basierte Bestimmung des Azorubingehaltes in kommerziell erhältlichen, gesüßten Getränken ermöglicht [VP]. Dabei stimmten die ermittelten Konzentrationen gut mit den Ergebnissen parallel durchgeführter HPLC-Messungen überein.

Die wasserunlöslichen Sudanfarbstoffe unterliegen ebenfalls der ständigen Kontrolle, da ihre Verwendung in Nahrungsmitteln, aufgrund ihrer karzinogenen Wirkung, in den meisten Ländern untersagt ist. Illegale Beimengungen von Vertretern dieser bedenklichen Farbstoffgruppe konnten in den vergangenen Jahren vor allem in Palmöl und rötlichen, pulverförmigen Gewürzmischungen gefunden werden. In den hier präsentierten Untersuchungen konnte Sudan III in Paprikapulver, durch den Einsatz von SERS-Substraten mit einer lipophilen Oberflächenmodifizierung, erfolgreich detektiert werden [MJ]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die modifizierten Substrate sowie der Einsatz von Methoden der multivariaten Statistik eine Quantifizierung des Farbstoffes in der Gegenwart wasserlöslicher Konkurrenz-moleküle, genauer Riboflavin, ermöglicht.

In beiden Studien sind planare SERS-Substrate zum Einsatz gekommen, die sich kostengünstig als Wegwerfmaterialien für den einmaligen Gebrauch herstellen lassen. Für die Experimente mit Azorubin sind AuFON-Strukturen auf einem Siliziumwafer verwendet worden [VP]. Das Raman-Signal des Substratmaterials konnte dabei gleichzeitig als Standard zur Normierung der gemessenen Spektren eingesetzt werden. Der Nachweis von Sudan III wurde auf Basis sogenannter enzymatisch generierter Silbernanopartikel (EGNP; engl.: *Enzymatic generated silver nanoparticles*) durchgeführt [MJ]. Ihre Herstellung beruht auf der reduzierenden Wirkung des Enzyms Meerrettichperoxidase, welches über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an der Oberfläche eines Glasobjektträgers immobilisiert wird. In Kontakt mit einer Silberio-

I. Einleitung

nen enthaltenden Lösung bewirkt das Enzym das Wachstum von wüstenrosenartigen Silberstrukturen, deren scharfe Kanten und große effektive Oberfläche (Vgl. Abbildung 2a [MJ]) geeignete SERS-Substrate darstellen. Als lipophile Oberflächenmodifizierung wurde eine Mischung der aliphatischen Kohlenwasserstoffe Octanthiol und Octadecanthiol, im Verhältnis 1:2, verwendet. Durch die hohe Affinität der Thiolgruppen zu Silber bildet sich eine selbstorganisierte Monolage auf der Oberfläche der Silberstrukturen aus.

Das grundlegende Messprinzip unterschied sich für beide Analyten nur geringfügig. Das entsprechende Substrat wurde für 30 min in die zu messende Lösung eingelegt und anschließend unter einem Luftstrom getrocknet. Im Fall der EGNP wurde das Substrat daraufhin mit dem verwendeten Lösungsmittel, Methanol, gewaschen und anschließend erneut getrocknet. Die Messungen selbst wurden mit Hilfe von Raman-Mikrospektrometern durchgeführt, wobei der piezoelektrische Probenstisch während der Aufnahme der Spektren kontinuierlich unter dem statischen Fokuspunkt bewegt wurde, um eine quadratische Fläche abzurastern. Auf diese Weise können Beiträge durch photodegradierte Analyt- und Matrixmoleküle auf die gemessenen Raman-Spektren minimiert werden. Gleichzeitig werden auf diese Weise Punkt-zu-Punkt-Schwankungen der Signalintensität durch Substratinhomogenitäten statistisch erfasst, wodurch die Reproduzierbarkeit der Messungen erhöht wird. Weitere Details zu den Messungen können den entsprechenden Publikationen entnommen werden [VP, MJ].

Die Aufnahme der SERS-Spektren von sieben kommerziell erhältlichen, zuckerhaltigen Getränken konnte, abgesehen von einer Verdünnung im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser, ohne zusätzliche Probenvorbereitung, durchgeführt werden. Wie aus Abbildung 3 [VP] sowie den ergänzenden Informationen (SI; engl.: Supplementary information) zum Artikel (vgl. Abbildung S3) entnommen werden kann, unterscheiden sich die resultierenden Spektren der Getränkeproben nur geringfügig von denen wässriger Azorubin-Lösungen. Das geringere Signal-zu-Rausch-Verhältnis lässt sich dabei auf die Einflüsse der Probenmatrix zurückführen und konnte durch die Verdünnung dieser teilweise kompensiert werden. Ein weiterer positiver Effekt des Verdünnens ist die weitgehende Unterdrückung von Untergrundsignalen, die durch in der Probe enthaltene Zucker verursacht werden. Gleichzeitig deutet das Fehlen weiterer charakteristischer Banden der Probenmatrix auf eine hohe Affinität des Analyten zur Goldoberfläche hin und bietet aus Sicht der Auswertung zwei wesentliche Vorteile. Zunächst kann auf die Verwendung komplexerer, multivariater Modelle verzichtet werden, da eine Quantifizierung auf der Grundlage der Intensität bzw. Fläche einzelner Markerbanden durchführbar ist. Darüber hinaus ist die Auf-

nahme separater Kalibrierungskurven für jedes einzelne, der sich in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheidenden Getränke, nicht notwendig. Stattdessen kann die Kalibrierung über wässrige Lösungen des Analyten durchgeführt werden.

Alle hierzu benötigten Berechnungen wurden mit Hilfe des Programmes *Origin-Pro* durchgeführt. Zunächst wurden die gemessenen Rohdaten auf der Grundlage einer Singulärwertzerlegung (engl.: *singular value decomposition*), dem der PCA zugrundeliegendem Verfahren, untergrundkorrigiert [123]. Darauf folgend wurden die beiden Banden bei 520 cm^{-1} und 1356 cm^{-1} mit Hilfe der Mittelpunktsregel numerisch integriert. Die erstgenannte Bande lässt sich dem Silizium-Substrat zuordnen, wohingegen die Zweite auf die N=N-Streckschwingung und die Streckschwingung der Naphtalin-Gruppen des Azorubins zurückgeht. Das Verhältnis der erhaltenen Bandenflächen, mit dem Siliziumsignal als Standard, ist anschließend doppeltlogarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen worden, woraufhin eine gewichtete lineare Regression durchgeführt wurde [VP]. Die resultierende Kalibriergerade konnte anschließend zur Bestimmung der Azorubin-Konzentration in den Getränkeproben herangezogen werden. Über einen Konzentrationsbereich von 4 mg/L bis 280 mg/L weisen die gewonnenen Ergebnisse eine hohe Übereinstimmung mit den Resultaten einer parallel durchgeführten HPLC-Untersuchung auf (Vgl. Tabelle 1 [VP]). Im Fall alkoholischer Getränke ergeben sich jedoch zu hohe Werte im Vergleich mit der Referenzmethode. Dies kann auf Grundlage der verringerten Oberflächenspannung durch das Vorhandensein von Ethanol und der damit verbundenen erhöhten Ablagerung des Analyten auf der Oberfläche erklärt werden. Zudem konnten zwei der Getränke, welche kein Azorubin enthalten, sicher als Negativproben identifiziert werden.

Die Detektion des fettlöslichen Sudan III in Paprikapulver wird im Vergleich dazu weitaus stärker durch spektrale Beiträge der Lebensmittelmatrix behindert. Aus diesem Grund wurde in der hierzu durchgeführten Arbeit das Ziel verfolgt, eine lipophile Oberflächenmodifizierung für SERS-Substrate zu etablieren, welche die Anlagerung des Analyten, nicht jedoch anderer, störender Moleküle, begünstigt [MJ]. Die verwendeten Monolagen aus einer Mischung aus Octan- und Octadecanthiol eignen sich aufgrund ihrer hydrophoben Wirkung besonders gut zur Abstoßung wasserlöslicher Substanzen und führen darüber hinaus zu einer Reduzierung der Untergrundbeiträge der wasserunlöslichen Matrixbestandteile (vgl. Abbildung 6 [MJ]). Versuche zur Verwendung dieser sogenannten lipophilen Sensorschichten (LSL; engl.: *Lipophilic sensor layer*) für quantitative Untersuchungen wurden anhand künstlich hergestellter Testlösungen erfolgreich durchgeführt. Hierzu wurden Sudan III und Riboflavin (auch Vitamin B₂) in Methanol gelöst und anschließend Mischungen hergestellt, wobei die Konzentration von Riboflavin konstant gehalten wurde. Das wasserlös-

I. Einleitung

liche Vitamin, welches auch Bestandteil von Paprikapulver ist, eignet sich dabei hervorragend zur Simulation einer stark störenden Probenmatrix. Seine typischen Markerbanden sind deutlich intensitätsreicher als jene von Sudan III und überlagern diese teilweise bis vollständig (vgl. Abbildung 4 [MJ]). Das Spektrum der Testlösung auf EGNP ohne LSL (orangene Kurve) wird von typischen Riboflavin-Banden dominiert. Eine Detektion von Sudan III ist somit ausgeschlossen. Der Einsatz der LSL (rote Kurve) verringert das Riboflavin-Untergrundsignal deutlich und typische Banden von Sudan III, vor allem bei 1135 cm^{-1} und 1597 cm^{-1} , treten hervor. Die Bande bei 1135 cm^{-1} kann den C-N-Streckschwingungen sowie C-H-Scherschwingungen in den Benzenringen zugeordnet werden, wohingegen die Bande bei 1597 cm^{-1} ihren Ursprung in den N=N-Streckschwingungen und den C-C-Scherschwingungen der Benzenringe hat [124].

Anhand der in Abbildung 5a [MJ] dargestellten Konzentrationsreihe wird ersichtlich, dass die Bande bei 1135 cm^{-1} im vorliegenden Fall das größte Potential für die Demonstration quantitativer Messungen aufweist, da sie selbst bei $1,25\text{ }\mu\text{mol/L}$ noch als Schulter der benachbarten Riboflavin-Bande detektierbar ist. Durch die Überlagerung mit dieser Bande ist die Verwendung einfacher univariater Modelle jedoch zu ungenau. Sowohl die numerische Integration unter Anwendung der Simpsonregel als auch die Anpassung mit der Summe zweier Lorentz-Kurven führten zu unbefriedigenden Ergebnissen. Aus diesem Grund fand ein zweistufiges multivariates Modell, bestehend aus PCA und PLS-Regression, Verwendung. Hierzu kamen die Funktionen *prcomp* und *plsr* aus den Paketen *stats* [125] und *pls* [126] zum Einsatz. Die PCA dient dabei zur Reduzierung der Dimensionalität des Problems, wobei zeitgleich überflüssiges Signalrauschen abgetrennt wird. Als Maß für die Vorhersagefähigkeit des erstellten Kalibriermodells wurde der mittlere quadratische Vorhersagefehler (RMSEP; engl.: *Root mean square error of prediction*) herangezogen, welcher für die Vorhersage auf den Trainingsdatensatz berechnet wurde. Für die Behandlung der Daten, was auch die Vorbehandlung der Rohdaten mit einschließt, kamen selbsterstellte Funktionen und Skripte zum Einsatz, die in der freien Programmierungsumgebung *GnuR* entwickelt wurden.

Den ersten Schritt der Datenanalyse stellte die Vorbehandlung, bestehend aus Interpolation, Untergrundkorrektur und Mittelwertbildung, der gemessenen Rohdaten dar. Die Interpolation mit kubischen *Splines* wurde dabei als Grundlage für eine später eventuell benötigte Wellenzahl-Kalibrierung durchgeführt. Bei dieser Kalibrierung wird die Wellenzahlachse anhand der Messung einer Referenzsubstanz korrigiert, um tägliche Verschiebungen durch den Messaufbau auszugleichen. Für die Untergrundkorrektur kam der SNIP-Algorithmus zum Einsatz. Die optimale Breite

des *Peak-Clipping*-Fensters, mit dem dimensionslosen Wert von 40, wurde durch eine manuell durchgeführte Testreihe ermittelt. Daran anschließend wurden die Mittelwerte über alle Spektren gebildet, die jeweils einer der erwähnten Rastermessungen angehören. Auf diese Weise konnte der RMSEP um ungefähr 20 % reduziert werden. Für die PCA wurde ausschließlich der spektrale Bereich zwischen 1110 cm^{-1} und 1170 cm^{-1} verwendet. Als unabhängige Eingangsvariablen für die PLS-Regression dienten die ersten vier *Scores* aus der PCA, mit deren Hilfe wiederum vier latente Variablen konstruiert wurden. Die Vorhersage der Konzentrationen des Trainingsdatensatzes aufgetragen über die wirklichen Konzentrationswerte ist in Abbildung 5b [MJ] zu sehen. Die Nachweisgrenze kann dabei über den RMSEP abgeschätzt werden, da sich eine geringere Änderung der Konzentration nicht mit Hilfe des Modells unterscheiden lässt. Demnach können Konzentrationen von $2.9\text{ }\mu\text{mol/L}$ nachgewiesen werden, was einer Menge von etwa 1 mg/kg Sudan III in Paprikapulver entsprechen würde. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Sensitivität der derzeitigen Standardmethode zur Detektion von Sudanfarbstoffen in Chillipulver auf Basis der LC, welche die Detektion von $0,5\text{ mg/kg}$ Sudan III erlaubt [127].

Zusätzlich sollte das Potential zur Detektion von Sudan III in Paprikapulverextrakten demonstriert werden. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit der Food GmbH (Jena, Deutschland) auf ein kommerziell verfügbares Extraktionsverfahren, der sogenannten QuEChERS-Methode (engl.: *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*), zurückgegriffen [128]. Der daraus resultierende, auf Acetonitril basierende Extrakt wurde anschließend in Methanol überführt, da die Intensität sowie das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der SERS-Spektren unter Verwendung dieses Lösungsmittels höher ist. Für die Messungen wurde der Extrakt im Verhältnis 1:10 mit der Analytlösung gemischt, die $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Sudan III enthielt. Auf diese Weise wurde eine verdünnte Probenmatrix mit einer Analytkonzentration von $9\text{ }\mu\text{mol/L}$ erhalten.

Die Spektren des reinen und versetzten Extrakts in Abbildung 6 [MJ] resultieren aus Messungen auf EGNP ohne (6a) und mit (6b) LSL. Die in allen gemessenen Kurven dominierenden Banden bei 1525 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} und 1005 cm^{-1} konnten Carotinoiden zugeordnet werden. Im Fall des reinen Extrakts bewirkt der Einsatz der LSL ausschließlich eine Verringerung der Intensität einer Bande bei 1200 cm^{-1} . Daraus lässt sich schließen, dass der überwiegende Teil des Untergrundsignals der Probenmatrix durch wasserunlösliche Substanzen verursacht wird. Weiterhin wird im Vergleich der Messungen ohne und mit LSL deutlich, dass sich die Gesamtintensität durch den Einsatz der Oberflächenmodifizierung verringert. Dies beruht darauf, dass die Moleküle aufgrund der zusätzlichen Monolage eine größere Distanz zur Oberfläche aufweisen und somit eine geringere Signalverstärkung erfahren. Im

I. Einleitung

Fall des versetzten Extrakts ist ohne LSL nur eine äußerst schwache Schulter bei 1597 cm^{-1} detektierbar. Unter Verwendung der LSL tritt diese Markerbande von Sudan III jedoch deutlich zutage und zusätzlich ist eine Schulter bei 1135 cm^{-1} zu sehen, die ebenfalls dem Analyten zugeordnet werden kann. Dies deutet daraufhin, dass die Analytmoleküle eine höhere Affinität zur Sensorschicht aufweisen und näher an die Metalloberfläche als andere Moleküle gelangen können. Ein Grund hierfür könnte die Verwendung unterschiedlich langer Alkanthiole zur Herstellung der LSL sein. In die dadurch entstehenden „taschenartigen“ Strukturen können die kleineren Sudan-Moleküle leichter eindringen als andere Matrixbestandteile, wie beispielsweise die langkettigen Carotinoide.

Die LSL ermöglicht somit die SERS-basierte Detektion von Sudan III trotz der Untergrundsignale des Paprikapulverextrakts. HPLC-basierte Verfahren können, in Abhängigkeit von der Auslesemethode, deutlich geringere Nachweisgrenzen erreichen [4]. Zur Erzielung von Werten bis zu $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ ist jedoch der gekoppelte Einsatz zweier Massenanalysatoren vonnöten, was einen deutlich erhöhten apparativen Aufwand bedeutet. Zudem soll an dieser Stelle auf den erhöhten Arbeitsaufwand zur Aufreinigung der gewonnenen Rohextrakte im Fall der HPLC erinnert werden.

In beiden Publikationen konnte erfolgreich aufgezeigt werden, dass die SERS-Spektroskopie als Schnelltest-Verfahren für Fragestellungen der Lebensmittelsicherheit eingesetzt werden kann. Durch den Einsatz transportabler Raman-Spektrometer könnten somit schnelle und kostengünstige Tests, direkt vor Ort, durchgeführt werden. Im Verdachtsfall können die entsprechenden Proben anschließend durch die Verwendung aufwendigerer Labormethoden, wie der HPLC, genauer quantifiziert werden. Die Komplexität des zur Anwendung kommenden Kalibriermodells, unter dem Gesichtspunkt einer robusten Analyse, hängt dabei entscheidend vom Einfluss der Lebensmittelmatrix ab. Im konkreten Fall der gesüßten Getränke kann, aufgrund des Fehlens starker Matrixeinflüsse, auf die Integration von Markerbanden zurückgegriffen und somit ein einfaches, univariates Modell verwendet werden. Die Extrakte des Paprikapulvers zeigen ein deutlich ausgeprägteres Untergrundspektrum, welches jedoch durch den Einsatz der LSL ausreichend reduziert werden kann, sodass eine Detektion des Farbstoffs möglich wird. Allerdings kann die Überlagerung der Analytbanden mit dem Untergrundsignal auf diese Weise nicht vollständig unterdrückt werden. Deshalb ist es hier notwendig das vorgeschlagene PCA-PLSR-Modell zu verwenden, auf dessen Basis quantitative Untersuchungen, trotz der störenden Einflüsse durch die Probenmatrix, möglich sind.

3.2. Quantifizierung klinisch relevanter Moleküle

Ein weiteres Anwendungsgebiet, in welchem starke Einflüsse durch die Probenmatrix zu erwarten sind, stellt die Überwachung des Medikamentenspiegels dar. Im Rahmen der Dissertation wurde die Durchführbarkeit der quantitativen Bestimmung zweier Antibiotika in Probenmatrices steigender Komplexität untersucht. Bei den verwendeten Medikamenten handelt es sich um LVX und NTX, die unter anderem zur Behandlung von Harnwegserkrankungen eingesetzt werden. Zunächst wurde das SERS-Spektrum des LVX-Moleküls anhand wässriger Lösungen charakterisiert und eine Bestimmung der Nachweisgrenze unter Verwendung der LOC-SERS-Technik vorgenommen [IH2]. Analog zu diesem Vorgehen entstand eine Vorarbeit zur Quantifizierung des Chemotherapeutikums MTX [IH1]. In beiden Fällen wurde eine univariate Kalibrierung auf Basis der Fläche einer Markerbande durchgeführt. Im Fall von MTX wurde ein Lorentz-Profil zur Bestimmung der Fläche an die Bande angepasst, wohingegen für LVX auf die numerische Integration zurückgegriffen wurde. Aufbauend auf der ersten, grundlegenden Studie, konnte LVX in einer weiterführenden Arbeit in simuliertem Urin sowie Urinproben von gesunden Spendern und Patienten nachgewiesen werden [IH3]. Darüber hinaus wurde hier die Durchführbarkeit quantitativer Messungen in einem medizinisch relevanten Konzentrationsbereich, auf Basis eines kombinierten PCA-PLSR-Modells, demonstriert. Die Frage nach dem Umgang mit einer ständig variierenden Probenmatrix, wie sie Urin darstellt, konnte hier noch nicht adressiert werden. Hierzu wurde in der NTX-Studie die SAM, anstelle eines Kalibriermodells, zur Quantifizierung eingesetzt [IH3]. Dabei wurden die abhängigen Variablen, welche in das univariate Modell der SAM eingehen, sowohl über die Integration der Bandenfläche als auch unter Verwendung der multivariaten MCR-ALS ermittelt. Anschließend wurden beide Verfahren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit miteinander verglichen.

Alle quantitativen Messungen wurden auf Basis eines Mikrofluidikchips durchgeführt, der nach dem Prinzip des segmentierten Flusses arbeitet und im Leibniz-Institut für Photonische Technologien (Jena, Deutschland) entwickelt wurde. Eine Darstellung des Chips ist in Abbildung 1 [IH2] zu sehen. Als SERS-Substrat wurden einfache Silberkolloide nach den Protokollen von Lee und Meisel [129] sowie Leopold und Lendl [130] eingesetzt. Die Lee-Meisel-Kolloide sind dabei ausschließlich zur Untersuchung von MTX zum Einsatz gekommen, da sie im Vergleich die geringere Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Chargen aufgewiesen haben. Zudem können die Leopold-Lendl-Kolloide bei Raumtemperatur hergestellt werden, wodurch das benötigte Laborequipment reduziert wird.

I. Einleitung

Zur Analyse der gemessenen Daten sind in allen Arbeiten selbsterstellte Skripte, unter Verwendung von *GnuR*, zum Einsatz gekommen. Die Vorbehandlung der Rohdaten beinhaltet das Abspalten aller Spektren vom Datensatz, die entweder kosmische *Spikes* oder Raman-Banden des Mineralöls enthalten. Letztere kommen durch den permanenten Fluss des Mineralöls zustande, wodurch sich während der durchgängig laufenden Aufnahme von Spektren abwechselnd Tropfen und Mineralöl im Fokus des Messobjektivs befinden. Die reinen Raman-Spektren des Mineralöls, welche zwischen den Tropfen gemessen wurden, können in einem weiteren Schritt als Grundlage für eine Wellenzahlkalibrierung dienen. Auf diese Weise lassen sich Schwankungen des Messaufbaus kompensieren, die eine Verschiebung sowie Stauchung oder Streckung der Spektren zur Folge haben. Eine solche Kalibrierung wurde exemplarisch für die Quantifizierung von NTX eingesetzt. Zusätzlich wurden die Spektren untergrundkorrigiert sowie nach Bedarf normiert, gemittelt und auf den gewünschten spektralen Bereich zugeschnitten. Für die Untergrundkorrektur wurde dabei der SNIP-Algorithmus aus dem Paket *Peaks* [131] angewendet.

Die Ermittlung der Nachweisgrenze (engl.: *Limit of detection*) wurde grundsätzlich auf Basis der Fläche von Markerbanden, unter Verwendung der Definition der IUPAC, durchgeführt. Hierzu wurden die Bandenflächen bestimmt und über die Konzentrationswerte aufgetragen. Die Nachweisgrenze ergibt sich dann als Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit einem zuvor festgelegtem Schwellwert, welcher als die Summe des Mittelwertes und der dreifachen Standardabweichung der Messungen einer negativen Blindprobe (Probe ohne Analyt) definiert ist. Wird stattdessen die zehnfache Standardabweichung verwendet, wird von der Bestimmungsgrenze (engl.: *Limit of quantitation*) gesprochen. Zur Abschätzung der Vorhersagefähigkeit der multivariaten Modell wurde erneut der RMSEP verwendet. Die Datensätze wurden dabei in einen Trainings- und einen Testdatensatz unterteilt. Da die daraus resultierenden Werte stark von der gewählten Aufteilung des Datensatzes abhängen, wurde zusätzlich eine sogenannte Kreuzvalidierung (CV; engl.: *Cross validation*) durchgeführt. In der hier verwendeten Version wurde der Datensatz in zehn zufällig gewählte Teildatensätze unterteilt. Anschließend wurden diese genutzt, um zehn Modelle zu trainieren, wobei jeweils einer der Teildatensätze ausgelassen wurde. Dieser Teildatensatz diente im darauf folgenden Schritt für die Vorhersage. Der RMSEP-CV ist dabei der Mittelwert der RMSEP für die zehn Einzelmodelle.

3.2.1. Univariate Kalibrierung für die Ermittlung der Nachweisgrenze und des linearen Bereichs

Vorversuche zur Charakterisierung der verwendeten Moleküle wurden anhand wässriger Lösungen von MTX [IH1] und LVX [IH2] durchgeführt. Eine wichtige Erkenntnis ist hierbei, dass das LVX-Molekül nicht nur eine hohe Affinität zur Silberoberfläche aufweist und dort, ebenso wie das MTX-Molekül, anbindet, sondern zudem die Aggregation der Nanopartikel auslöst. Da die Signalintensität durch den Einsatz des Aggregierungsmittels, im konkreten Fall KCl, sogar negativ beeinflusst wurde (Vgl. Abbildung 3 [IH2]), ist auf dessen Einsatz in den Experimenten komplett verzichtet worden. Eine Erklärung hierfür könnte die zusätzliche Agglomeration durch die Zugabe von KCl sein, in deren Folge zu große Agglomerate der Partikel entstehen. Dadurch verschiebt sich die Plasmonenresonanz zu sehr in den roten Spektralbereich und die Signalverstärkung bei der verwendeten Wellenlänge von 532 nm sinkt. Weiterhin wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Intensität der MTX-Banden untersucht. Hierbei konnten die besten Resultate bei pH 12 erzielt werden (Vgl. Abbildung 4 [IH1]), weshalb für die späteren Konzentrationsreihen eine entsprechende Pufferlösung zugesetzt wurde. Neben der Untersuchung von Faktoren, die einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der SERS-Spektren haben, dienten die Experimente zur Abschätzung des zu erwartenden linearen Bereichs der Messungen sowie der prinzipiell möglichen Nachweisgrenzen. Auf der Grundlage dieser sollte anschließend entschieden werden, ob eine Weiterführung der Experimente mit komplexeren Probenmatrices sinnvoll erscheint. Zur Bestimmung der Flächentypischer Markerbanden wurden hierbei zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Im Fall von MTX wurde ein Lorentz-Profil angepasst, wohingegen für die LVX-Messungen eine numerische Integration durchgeführt wurde.

MTX wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,16 – 100 µmol/L untersucht. Ausgewählte Spektren dieser Reihe sind in Abbildung 5 [IH1] zu sehen. Die weitestgehend freistehende Bande bei 965 cm⁻¹, welche der Ring-”Atmungs”-Schwingung des Benzenrings zugeordnet werden kann, eignete sich am Besten zur Anpassung des Lorentz-Profiles. Hierzu kam die Funktion *nls* des Pakets *stats* [125] unter Verwendung der Gleichung

$$y = y_0 + \frac{A\gamma}{(x_c - x)^2 + \gamma^2}$$

zum Einsatz. Dabei sind x_c die Position, A die Fläche und γ die Halbwertsbreite der Bande. Der Parameter y_0 beschreibt den vertikalen Versatz der Kurve. Die Startwerte für x_c , y_0 und A wurden aus den Daten abgeschätzt, für γ wurde hingegen ein manuell vorgegebener Wert verwendet. Für den Fall einer nicht konvergierenden

I. Einleitung

Lösung wurde γ zufällig in einem vorgegebenen Bereich variiert und eine erneute Anpassung durchgeführt. Nach einer festgesetzten Anzahl von 20 Versuchen, wurde der Prozess abgebrochen und das Spektrum nicht mit in die Auswertung einbezogen. Neben der Konvergenz dienten weitere Kriterien zur Auffindung physikalisch nicht sinnvoller Lösungen. So sollten sich Position und Halbwertsbreite innerhalb der vorgegebenen Grenzen bewegen und die Höhe der angepassten Kurve das anderthalbfache des Rauschens an einer zuvor festgelegten Stelle, an welcher sich keine Bande befindet, übersteigen.

In Abbildung 6 [IH1] wurden die resultierenden Flächen über die Konzentrationswerte aufgetragen. Im Bereich von $0,2 - 2,0 \mu\text{mol/L}$ ist eine ausgezeichnete lineare Abhängigkeit der Signale von der Konzentration zu beobachten. Für Konzentrationen höher als $10 \mu\text{mol/L}$ gehen die Werte in Sättigung über. Ein Grund hierfür ist das limitierte Volumen der *Hot-Spots* zwischen den aggregierten Nanopartikeln. Daher trägt eine zusätzliche Vergrößerung der Anzahl an Molekülen ab einer gewissen Konzentration nur noch geringfügig zu einer weiteren Erhöhung des Signals bei. Die MTX-Konzentration im Blutplasma des Patienten sollte 42 Stunden nach der Einnahme, einer für die Krebstherapie üblichen Dosis, einen Wert von $\leq 1 \mu\text{mol/L}$ aufweisen. Beträgt die Konzentration mehr als $10 \mu\text{mol/L}$ besteht ein hohes Risiko für das Auftreten toxischer Nebenwirkungen. Daher kann der klinisch relevante Konzentrationsbereich auf $0,1 - 10 \mu\text{mol/L}$ festgesetzt werden, wobei für die Fortführung der Therapie entscheidend ist, ob der Wert unter $1 \mu\text{mol/L}$ gefallen ist oder nicht. Anhand der geringsten Konzentration, für welche die Markerbande bei 965 cm^{-1} detektiert werden konnte, wurde eine Nachweisgrenze von $0,17 \mu\text{mol/L}$ abgeschätzt. Dieser Wert liegt nahe der unteren Grenze des relevanten Bereichs. Zudem erstreckt sich der lineare Bereich über den Wert von $1 \mu\text{mol/L}$ hinaus. Somit lässt sich auf Basis der LoC-SERS-Technik prinzipiell eine Aussage darüber treffen, ob das Risiko einer Überdosierung vorliegt oder nicht. Im Fall eines positiven Ergebnisses könnte daraufhin ein aufwändigeres Verfahren zur Bestätigung der Resultate eingesetzt werden.

Als Alternative zur Anpassung mit einem Lorentz-Profil, wurde die Bandenfläche im Fall von LVX über die numerische Integration ermittelt. Hierzu kam die Simpsonregel zur Anwendung, die in der die Funktion *sintegral* aus dem Paket *Bolstad*[132] implementiert ist. Das SERS-Spektrum von LVX weist im Bereich von $1200 \text{ cm}^{-1} - 1800 \text{ cm}^{-1}$ mehrere deutliche, sich einander überlagernde Banden auf (Vgl. Abbildung 3 [IH2]), wovon die prominente Bande bei 1395 cm^{-1} zur Ermittlung der Nachweisgrenze ausgewählt wurde. Den Ursprung dieser Bande bilden die Schwingungen des Chinolon-Ringsystems in Kombination mit der COO^- -Streckschwingung.

Aus der Überlagerung der Signale in diesem Bereich resultiert ein Untergrundsignal, welches nur schwer abgeschätzt werden kann. Die Fläche der ausgewählten Bande kann jedoch ohne Bedenken für quantitative Untersuchungen verwendet werden, da der Untergrund die selbe Abhängigkeit von der Konzentration aufweist wie das Signal der Markerbande selbst. Dies ist der Fall, da es sich um reine Analytlösungen handelt und somit ausschließlich Schwingungen der LVX-Moleküle zum Untergrund beitragen.. Ferner sind die Bandenverhältnisse sowie ihre Positionen nicht von der Konzentration abhängig.

Die ermittelten Bandenflächen für den Konzentrationsbereich von 1 – 100 $\mu\text{mol/L}$ sind in Abbildung 6 [IH2] dargestellt. Zusätzlich wurde die Fläche des Signals bei 230 cm^{-1} bestimmt, welches der Ag-O-Streckschwingung adsorbierter LVX-Moleküle zugeordnet werden kann. Da ungebundene Moleküle keinen Beitrag zu dieser Bande liefern, ist ihre Fläche proportional zur Anzahl der Adsorbate. Aus diesem Grund konnte die Bandenfläche als interner Standard verwendet werden. Für Konzentrationen größer als 14 $\mu\text{mol/L}$ gehen jedoch beide Signale in die Sättigung über. Zudem verändert sich das Verhältnis an dieser Stelle von ≤ 1 auf ≥ 1 . Hierfür ist der unterschiedliche Ursprung beider Signale verantwortlich. Während zur Ag-O-Bande ausschließlich adsorbierte LVX-Moleküle beitragen, resultiert das Signal der Bande bei 1395 cm^{-1} zusätzlich von Analytmolekülen, die sich im Bereich der *Hot-Spots* aufhalten, jedoch nicht an der Oberfläche gebunden sind. Deshalb tritt im Fall des Ag-O-Signals bereits bei geringeren Konzentrationen die Sättigung ein. Unter Verwendung des Standards erstreckt sich der lineare Bereich von 0 – 15 $\mu\text{mol/L}$, mit einer Korrelation von 0,99 (Vgl. Abbildung 7 [IH2]). Die Nachweisgrenze ergibt sich nach der Definition der IUPAC zu 0,8 $\mu\text{mol/L}$. Die Konzentration von LVX in Urin, 4 – 12 h nach Einnahme des Medikaments, liegt im Bereich von $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^2 \mu\text{mol/L}$. Die Nachweisgrenze der LoC-SERS-Technik für wässrige Lösungen von LVX ist demzufolge niedrig genug, sodass die Bestimmung in Urin prinzipiell möglich ist. Hinsichtlich des linearen Bereichs könnte mit verdünnten Proben gearbeitet und anschließend auf die Ursprungskonzentration zurückgeschlossen werden.

In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass die LoC-SERS-Technik grundsätzlich die notwendigen Anforderungen, bezüglich Nachweisgrenze und linearem Bereich, für eine Überwachung des Medikamentenspiegels von MTX und LVX erfüllt. Da die Messungen in wässrigen Lösungen durchgeführt wurden, konnte in beiden Fällen ein einfaches univariates Modell zum Einsatz kommen. Dies reduziert den Rechenaufwand und ermöglicht eine einfachere Interpretation der Ergebnisse. Im Fall intensitätsschwacher Signale mit hohem Rauschen stellt die Anpassung eines Lorentz-Profils jedoch eine Herausforderung dar. Neben Problemen mit der Konvergenz kön-

I. Einleitung

nen physikalisch nicht sinnvolle Lösungen resultieren. Zudem kann für die Negativkontrolle, aufgrund des Ausbleibens einer Bande im entsprechenden Bereich, keine Anpassung durchgeführt werden. Dementsprechend mussten die zugehörigen Werte auf null gesetzt werden. Die numerische Integration weist in diesen Fällen keine Probleme auf, da hier ausschließlich die Fläche unter der Kurve bestimmt wird. Dafür hängen die Ergebnisse stark von der verwendeten Untergrundkorrektur ab. Weiterhin können benachbarte Banden, die eine abweichende Konzentrationsabhängigkeit aufweisen, die Resultate negativ beeinflussen. Die Anpassung mit der Summe aus zwei oder mehreren Lorentz-Profilen bietet in diesen Fällen eine mögliche Alternative, ist jedoch bei stark überlagerten Signalen oft instabil. Diesen Überlegungen folgend, wurde für die im Folgenden vorgestellten Arbeiten auf die numerische Integration zurückgegriffen. Ein wichtiges Kriterium war dabei der Umstand, dass die Messung negativer Blindproben auf diese Weise problemlos möglich ist. Somit konnte die Definition der IUPAC zur Abschätzung der Nachweisgrenzen eingesetzt werden, welche auf den Resultaten von Blindprobenmessungen beruht.

3.2.2. Multivariate Kalibrierung für quantitative Analysen in komplexen Probenmatrizes

Den nächsten Schritt auf dem Weg zur Quantifizierung von LVX in Urin, stellten Experimente mit simuliertem Urin dar. Auf diese Weise konnten wesentliche Einflussparameter auf die SERS-Messungen in einer komplexen Probenmatrix untersucht werden. Zudem konnte die Komplexität der Probenzusammensetzung schrittweise erhöht werden, um Rückschlüsse auf die Beiträge der verschiedenen Bestandteile ziehen zu können. Die genaue Zusammensetzung des simuliertem Urin, der einen pH-Wert von pH 5 aufweist, kann dem Abschnitt Probenvorbereitung in [IH3] entnommen werden. Im Wesentlichen handelt es sich um eine wässrige Lösung aus neun verschiedenen Salzen, der die beiden Stoffwechselprodukte Harnstoff und Creatinin zugesetzt werden.

Die Spektren des reinen sowie mit LVX versetztem simuliertem Urin sind in Abbildung 1 [IH3] zu sehen. Die Beiträge der Matrix beschränken sich hauptsächlich auf die C-N-Streckschwingung des Harnstoff-Moleküls bei 990 cm^{-1} sowie den C-H-Schwingungen im Bereich von $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$. Obwohl die beiden LVX-Markerbanden bei 1391 cm^{-1} und 1611 cm^{-1} somit nicht vom Untergrundsignal überlagert werden, hat die Probenmatrix einen deutlichen Einfluss auf das SERS-Spektrum des Analyten. So verringert sich die Gesamtintensität sowie die Bandenverhältnisse des LVX-Spektrums. Dies lässt sich auf das Vorhandensein zusätzlicher Moleküle zurückführen, welche um die verfügbaren Bindungsplätze an der Silberober-

fläche konkurrieren und außerdem die Bildung zu großer Nanopartikel-Agglomerate bewirken. In diesem Zusammenhang konnten vor allem die Salze als wesentliche Störfaktoren identifiziert werden. Die Nachweisgrenze verringert sich infolgedessen um etwa zwei Größenordnungen von $0,8 \mu\text{mol/L}$, im Fall wässriger Lösungen, auf einen Wert von $0,055 \text{ mmol/L}$ (Vgl. Abbildung 3 [IH3]). Zur Ermittlung des Wertes wurde erneut die Bande bei 1391 cm^{-1} verwendet, wobei die Untergrundkorrektur mit einem sehr kleinem Wert für das *Peak-Clipping*-Fenster von 16 durchgeführt wurde. Dadurch ließ sich der Beitrag benachbarter Banden zur Fläche der verwendeten Markerbande auf ein Minimum reduzieren. Optimale Ergebnisse konnten durch Verdünnung der Probenmatrix sowie der Verwendung kurzer Mischzeiten, von Probe- und Kolloidlösung, erzielt werden. Aus diesem Grund wurden die Urinproben in den späteren Versuchen ebenfalls in einem Verhältnis von 3:11 mit Wasser verdünnt. Der lineare Bereich erstreckt sich im Fall der verdünnten Probe von $0,07 - 0,7 \text{ mmol/L}$. Dies entspricht dem klinisch relevanten Bereich 12 Stunden nach Einnahme einer typischen Menge LVX von 500 mg.

Weiterhin konnte mit Hilfe des simulierten Urins der Einsatz des kombinierten PCA-PLSR-Modells, für die später gezeigten Messungen des Analyten in Urin, erprobt werden. Während im Fall der simulierten Körperflüssigkeit auf die Verwendung des multivariaten Modells verzichtet werden kann, macht das komplexe Untergrundsignal des Urins, vor allem im Bereich der Markerbanden (Vgl. Abbildung 4 [IH3]), seinen Einsatz unumgänglich. Für den Test wurden drei unabhängige Konzentrationsreihen in unverdünntem, simuliertem Urin aufgenommen. Zwei davon dienten als Trainingsdatensatz und der verbleibende Datensatz wurde dafür verwendet, um die Vorhersagefähigkeit des Modells zu erproben. Jeweils drei Spektren wurden zunächst gemittelt, untergrundkorrigiert und auf den spektralen Bereich von $300 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ zugeschnitten. Für den SNIP-Algorithmus wurde dabei ein breiteres *Peak-Clipping*-Fenster von 60 gewählt, da nun ein großer spektraler Bereich verwendet wurde und eine niedrige Fensterbreite den Verlust zusätzlicher Informationen verursachen könnte. Die ersten vier *Scores* der PCA wurden an die PLS übergeben, woraus wiederum vier latente Variablen erzeugt und zur späteren Vorhersage verwendet wurden. Die optimale Anzahl latenter Variablen wurde dabei durch manuelle Testreihen, unter Verwendung des RMSEP der Vorhersage auf den Trainingsdatensatz, ermittelt. Das trainierte Modell wies einen RMSEP-CV von $0,048 \text{ mmol/L}$ auf. Dieser Wert liegt, genau wie der RMSEP für den Testdatensatz, der $0,058 \text{ mmol/L}$ betrug, nahe der zuvor ermittelten Nachweisgrenze.

Basierend auf den erfolgreichen Vorversuchen, kam das präsentierte Modell zur Untersuchung der klinischen Proben zum Einsatz. Für die Experimente mit Urin

I. Einleitung

standen insgesamt neun Patientenproben zur Verfügung, welche vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt wurden. Drei der anonymisierten Proben wurden positiv auf das Vorhandensein von Antibiotika getestet, wohingegen die restlichen Proben keine antibakterielle Wirkung aufwiesen. Insgesamt sind drei Sammelproben, sogenannte „gepoolte“ Proben, aus jeweils drei Einzelproben hergestellt worden. Alle Proben, die in P0 eingegangen sind, waren frei von Antibiotika und wurden ebenfalls separat, als S1 – S3 bezeichnet, untersucht. P1 setzte sich aus den drei positiv und P2 aus den restlichen negativ getesteten Proben zusammen.

Bei einem Vergleich der Spektren des reinen Urins untereinander (Vgl. Abbildung 4 [IH3]) tritt die hohe chemische Variabilität der verschiedenen Proben zutage. Dies wird auch anhand der unterschiedlichen pH-Werte deutlich, welche sich zwischen pH 5,35 und pH 7,19 bewegen. Die hohe Diversität wirkt sich beispielsweise auf die Bildung der Nanopartikel-Agglomerate aus, weshalb die Signalverstärkung zwischen den Proben schwankt. Die Matrixsignale im Spektralbereich typischer LVX-Markerbanden stammen unter anderem von aromatischen Ringen, welche in der Harnsäure oder in Häm-Gruppen vorzufinden sind. Das Signal bei 637 cm^{-1} , welches der Harnsäure zugeordnet werden kann, wurde im Folgenden als Standard verwendet. Wie aus Abbildung S8 in den SI zu [IH3] zu entnehmen ist, lässt sich auf diese Weise eine vergleichbare Erhöhung der Linearität der Signale, wie unter Verwendung der bereits genutzten Ag-O-Bande, erzielen. Mit dem Vorteil, dass Harnsäure ein intrinsischer Bestandteil des Urins ist und demnach auch dann vorhanden ist, wenn die Probe kein LVX enthält.

Trotz der großen Unterschiede zwischen den Untergrundspektren der verschiedenen Proben sind in allen Fällen die beiden markanten LVX-Signale bei 1391 cm^{-1} und 1611 cm^{-1} deutlich zu sehen. Für den Test des PCA-PLSR-Modells wurden die sechs Datensätze, von den Einzelproben S1 – S3 und den Sammelproben P0 – P2, jeweils zufällig in zwei Teildatensätze unterteilt. Einer davon diente dem Training und der Andere der Validierung des Modells. Da eine solche Vorgehensweise Ergebnisse liefert, die stark von der jeweiligen Aufteilung der Datensätze abhängen kann [72], wurde zusätzlich anhand der Testdatensätze eine 10-fache Kreuzvalidierung durchgeführt. Die Ergebnisse der Vorhersagen sind in Abbildung 5 [IH3] dargestellt. Zudem können der Tabelle S3 in den SI zu [IH3] die einzelnen RMSEP-Werte für Vorhersage und Kreuzvalidierung entnommen werden. In allen Fällen konnte die Konzentration über den Bereich von $0,45 - 1,8\text{ mmol/L}$ mit einem RMSEP von $0,057\text{ mmol/L}$, im besten Fall (P0), bis zu $0,16\text{ mmol/L}$ vorhergesagt werden. Die gefundenen Werte decken sich ebenfalls mit den Resultaten der zusätzlich durchge-

führten Kreuzvalidierung. Dabei entsprechen die gefundenen Werte dem Gehalt in Urin gesunder Probanden vier Stunden nach der Einnahme von 500 mg. In der entsprechenden Studie wurde ein Mittelwert von $1,38 \pm 0,68$ mmol/L gemessen, wobei der geringste Messwert 0,45 mmol/L betrug [133].

Darüber hinaus wurde die Messung mit Probe S1 unter Verwendung zweier unterschiedlicher Chargen von Silberkolloiden wiederholt. Während eine der beiden Chargen zum Zeitpunkt der Messung bereits sieben Monate alt war, wurde die Andere frisch hergestellt. Für Training und Validierung des Modells wurden je einer der beiden erhaltenen Datensätze verwendet. Der RMSEP erhöht sich dabei auf einen Wert von 0,16 mmol/L, verglichen mit 0,088 mmol/L, im Fall der Verwendung einer Charge für Modellbildung und Vorhersage. Dennoch liegt der Wert unterhalb der geforderten Nachweisgrenze von 0,45 mmol/L. Dies spricht für die Stabilität der Leopold-Lendl-Kolloide, genauso wie für die Zuverlässigkeit des verwendeten Modells. In einem weiteren Test konnte zudem demonstriert werden, dass ein transportables Raman-Mikrospektroskop ebenfalls zur Überwachung des Medikamentenspiegels eingesetzt werden kann. Das verwendete Gerät ist zusammen mit den Ergebnissen in Abbildung S11 in den SI zu [IH3] abgebildet. Trotz des höheren Signalrauschens (Vgl. Abbildung 6 [IH3]) des transportablen Spektrometers, konnte ein RMSEP von 0,11 mmol/L ermittelt werden. Das Rauschen lässt sich durch das Fehlen einer Kühlung der spektralen Kamera erklären. Zur Ermittlung des RMSEP wurde in diesem Fall der gesamte Datensatz für das Training sowie die Vorhersage verwendet. Auffällig ist dabei die geringere Zuverlässigkeit bei der Vorhersage der höheren Konzentrationswerte. Dies deutet auf einen reduzierten linearen Bereich im Vergleich zu den bisher gezeigten Ergebnissen hin. Werden nur die Werte bis zu einer Konzentration von 1,3 mmol/L verwendet, verringert sich die Abweichung der vorhergesagten Werte. Dies ist auch anhand der Ergebnisse, die aus einer Unterteilung in Test- und Validierungsdatensatz folgen, in Abbildung 6 [IH3] zu sehen. Hier ergab sich ein RMSEP von 0,04 mmol/L.

Insgesamt konnte demonstriert werden, dass auf der Grundlage eines kombinierten PCA-PLSR-Modells die Quantifizierung von LVX in Urin möglich ist. Dabei wurde der klinisch relevante Konzentrationsbereich, zur Überprüfung des Medikamentenspiegels vier Stunden nach der Einnahme des Wirkstoffes, adressiert. Der Einsatz des multivariaten Modells ermöglicht die Verwendung eines größeren spektralen Bereichs, anstatt einer einzelnen Markerbande, wodurch ein größerer Anteil der Informationen aus den Spektren für die Analyse genutzt werden kann. Durch die zusätzliche Verwendung der PCA verringert sich die Rechenzeit für das PLS-

I. Einleitung

Modell und überflüssige Informationen, wie Teile des Signalrauschens, werden vor der Verwendung der PLS abgespalten.

3.2.3. Standardadditionsmethode für stark variierende Probenmatrizes

Ein wichtiges Thema, welches mit Hilfe des bisher verwendeten Modells nicht adressiert werden kann, ist die hohe Variabilität von Körperflüssigkeiten. Die genaue Zusammensetzung von Urin unterliegt dabei nicht nur den individuellen Schwankungen unterschiedlicher Patienten, sondern hängt im Fall eines einzelnen Patienten ebenfalls vom Zeitpunkt der Probenentnahme ab. Würde das PCA-PLSR-Modell mit einer Urinprobe trainiert und einer stark davon abweichenden Probe validiert werden, ist die Wahrscheinlichkeit ungenauer Vorhersagen groß. Die Verwendung einer Sammelprobe, bestehend aus vielen Einzelproben verschiedener Spender, erscheint daher für die Erstellung des Kalibriermodells ratsam. Trotzdem können sich die Untergrundspektren der zu untersuchenden Probe und der Mischprobe stark voneinander unterscheiden, was ein Versagen des Kalibriemodells verursachen kann. Eine Möglichkeit dies zu umgehen stellt die SAM dar. Hierbei wird die unbekannte Probe sowohl pur und als auch mit dem Analyten versetzt gemessen. Dies geschieht häufig in mehreren Konzentrationsschritten, welche hier als SAS bezeichnet werden. Liegt ein linearer Zusammenhang zwischen der Messgröße und der Konzentration der SAS vor, kann aus einer Ausgleichsgeraden, welche bis zum Schnittpunkt mit der Abszisse extrapoliert wird, die unbekannte Konzentration abgelesen werden.

Als konkretes Beispiel zur Erprobung der SAM auf Basis der LOC-SERS-Technik wurde hierbei das Antibiotikum NTX in Urinproben ausgewählt [IH4]. Insgesamt wurden zehn Proben von anonymisierten Spendern untersucht. Fünf davon stammten von gesunden Spendern (HV; engl.: *Healthy volunteer*) und fünf weitere Proben von Patienten (PS; engl.: *Patient sample*), die Teil einer Studie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena waren. Keiner der Spender befand sich in der Zeit vor der Entnahme in Behandlung mit NTX, weshalb die Proben künstlich mit dem Antibiotikum versetzt wurden. Die Proben HV1 – HV3 dienten Voruntersuchungen, mit dem Ziel, den linearen Bereich sowie die Nachweisgrenze für NTX in Urin zu ermitteln. Dafür wurden Konzentrationsreihen im Bereich von 4,28 – 42,8 $\mu\text{mol/L}$ erstellt. Die restlichen Urinproben fanden später als „unbekannte“ Proben für die SAM Verwendung. Durch Zugabe konzentrierter NTX-Lösung wurde die Konzentration im Urin auf einen Wert von 21 $\mu\text{mol/L}$ eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von 10.5 $\mu\text{mol/L}$ in den Tropfen des Mikrofluidikchips. Dieser Wert wurde in den Experimenten als Sollwert für die Bestimmung verwendet.

Aus den gewonnenen spektralen Daten muss zunächst eine Messgröße extrahiert werden, welche im univariaten Modell der SAM als abhängige Variable verwendet werden kann. Eine einfach zugängliche Größe stellt die Fläche von Markerbanden dar. Ein Vergleich der Vorexperimente anhand wässriger Lösungen des Antibiotikums (Vgl. Abbildung 2 [IH4]) mit den Messungen in Urinproben (Vgl. Abbildung 3 [IH4]) zeigt deutlich, dass die meisten Banden einen starken Überlapp mit dem Untergrundsignal der Probenmatrix aufweisen (siehe auch Abbildung S5, SI zu [IH4]). Das NTX-Signal bei 840 cm^{-1} , das C-H-Biegeschwingungen (außerhalb der Ebene) in den aromatischen Ringen zugeordnet werden kann, wird jedoch nur geringfügig durch das Spektrum des Urins beeinflusst. Die Nachweisgrenze, welche auf Basis dieser Markerbande ermittelt wurde, steigt von $2,38\text{ }\mu\text{mol/L}$, im Fall wässriger Lösungen, auf $3,43\text{ }\mu\text{mol/L}$ an. Verglichen mit der Situation des LVX-Moleküls ist diese Veränderung sehr klein. Zudem erstreckt sich der lineare Bereich im Fall der Urinproben von $4,28\text{ }\mu\text{mol/L}$ bis $42,8\text{ }\mu\text{mol/L}$, was den gesamten medizinisch relevanten Bereich ($10 - 40\text{ }\mu\text{mol/L}$) abdeckt. Die Bestimmungsgrenze genügt mit $6,5\text{ }\mu\text{mol/L}$ ebenfalls den Zielerfordernissen. Aus diesen Gründen eignet sich die Fläche der verwendeten NTX-Bande als Messgröße für die SAM.

In Abbildung 4 [IH4] sind die Resultate der linearen Regression auf Basis der Bandenflächen zu sehen. Die vorhergesagten Werte für die „unbekannte“ Konzentration lagen zwischen $5,8\text{ }\mu\text{mol/L}$ und $13,2\text{ }\mu\text{mol/L}$ (Vgl. Tabelle 1 [IH4]), was einem mittleren absoluten prozentualen Fehler (MAPE; engl.: *Mean absolute percentage error*) von $21,4\%$ entspricht. Das beste Ergebnis konnte dabei für Probe PS1 erzielt werden, mit einem relativen Fehler von $6,1\%$. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle anhand der unversetzten Urinproben durchgeführt. Die Vorhersagen lagen in diesem Fall eine Größenordnung unter den Konzentrationswerten der versetzten Proben. Anhand dieser Ergebnisse könnte voreilig geschlussfolgert werden, dass die Verwendung komplexerer Modelle nicht notwendig ist. Wird jedoch eine Bande ausgewählt, die stärker durch das Untergrundsignal überlagert wird, verringert sich die Qualität der Ergebnisse dramatisch. Als Beispiel diene das NTX-Signal bei 997 cm^{-1} , welches auf C-H-Biegeschwingungen (in der Ebene) zurückgeführt werden kann. Für den MAPE wurde hierbei ein Wert von 144% berechnet. Dies zeigt deutlich, dass die verwendete Methode nur im Fall nicht überlagerter Banden funktioniert.

Als alternativer Ansatz fand die MCR-ALS Verwendung, die mit Hilfe der Funktion *als* aus dem Paket *ALS* [134] implementiert wurde. Dabei findet eine iterative Zerlegung der gemessenen Spektren in ihre Einzelbeiträge statt. Basierend auf der Annahme eines Zwei-Komponenten-Systems, wurden die Spektren in die Beiträge des Analyten sowie der Probenmatrix als Ganzes zerlegt. Als Referenzspektren,

I. Einleitung

für den Start des iterativen Prozesses, dienten dabei die Spektren einer wässrigen NTX-Lösung sowie der entsprechend zugehörigen, unversetzten Urinproben HV4, HV5 sowie PS1 – PS5. Die Konzentrationsprofile, welche für die spektralen Einzelbeiträge berechnet wurden, dienten später als Messgröße für die SAM. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn der spektrale Bereich auf $600 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ zugeschnitten wurde, sodass vor allem die beiden prominenten Markerbanden der C-H-Biegeschwingungen in die Auswertung eingehen. Zudem wurde auf eine Untergrundkorrektur verzichtet, das Abruchskriterium auf einen Wert von $1 \cdot 10^{-3}$ festgesetzt und nichtnegative Werte für die Konzentrationsprofile und Intensitäten gefordert.

Die iterativ ermittelten Kurven, welche als die spektralen Beiträge beider Komponenten aufgefasst werden können, sind in Abbildung S7 in den SI zu [IH4] dargestellt. Zum Vergleich wurden die jeweils zugehörigen Referenzspektren mit eingezeichnet. Die Übereinstimmung zwischen den gemessenen und angepassten Kurven ist insgesamt gesehen hoch. Der mittlere Korrelationskoeffizient (Pearson-Korrelation) liegt bei 0,978. Die Einzelwerte können der Tabelle S7 in den SI zu [IH4] entnommen werden. Im Fall der Kurven für HV4, HV5 und PS5 können jedoch größere Abweichungen beobachtet werden, was sich auch in den zugehörigen Korrelationskoeffizienten niederschlägt. Bei HV4 und PS5 treten in den berechneten Kurven für die Probenmatrix fälschlicherweise Beiträge von Analytbanden in Form positiver oder negativer Signale auf. Zudem variiert in allen Fällen das Bandenverhältnis der beiden prominenten Signale bei 840 cm^{-1} und 997 cm^{-1} in der Analytkurve, wenn der Vergleich mit dem Referenzspektrum gezogen wird. Dies deutet auf Resteinflüsse der Probenmatrix hin, da die Bande bei 997 cm^{-1} vom Untergrundsignal überlagert wird, jene bei 840 cm^{-1} jedoch nicht. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass sich die Analytbeiträge mit Hilfe der MCR-ALS erfolgreich aus den Mischspektren extrahieren lassen.

Mit Hilfe der erhaltenen Konzentrationsprofile konnten vier der sieben Proben mit einem relativen Fehler kleiner als 10 % vorhergesagt werden. Unter Verwendung der Bandenfläche gelang dies nur im Fall von PS1. Mit einem Wert von 21,1 % bewegt sich der MAPE jedoch im selben Bereich wie unter Verwendung des rein univariaten Modells. Der Grund dafür sind die hohen relativen Fehler der Vorhersagen für die Proben HV4, PS4 und PS5. Ein Vergleich der Resultate beider Modelle zeigt, dass eine genaue Vorhersage für diese drei Proben, ungeachtet der verwendeten Methode, nicht möglich ist. Währenddessen für HV4 zu hohe Konzentrationen ermittelt wurden, ergaben sich für PS4 und PS5 zu geringe Werte. Dabei besteht, vor allem bei den beiden letztgenannten Proben, ein deutlicher linearer Zusammenhang

zwischen dem gemessenen Signal des Analyten und der Konzentration, sodass mangelnde Linearität als Ursache für diese Abweichungen ausgeschlossen werden kann (Vgl. Abbildung 4 [IH4]). Störende Einflüsse der Probenmatrix können die Zerlegung der Spektren mit Hilfe der MCR-ALS erschweren, wie bei den Proben HV4 und PS5 zu sehen ist. Allerdings ist dies bei Probe PS4, mit Korrelationskoeffizienten nahe eins, nicht der Fall. Dennoch lieferte das Modell für diese Messung ein zu niedriges Ergebnis.

Daher liegt der Schluss nahe, dass die Ursache für die hohen relativen Fehler im Experiment selbst zu suchen sind. Für die einzelnen SAS wurde die „unbekannte“ Probe manuell mit unterschiedlichen Volumina der Standardlösung versetzt und anschließend, für die chip-basierenden Messungen, auf das selbe Volumen verdünnt. Die dabei unvermeidbaren Ungenauigkeiten könnten die beobachteten Abweichungen verursacht haben. Werden die drei zuvor genannten Proben nicht mit in die Berechnung einbezogen, ergibt sich für die MCR-ALS ein MAPE von 6,2 %. Verglichen mit dem Wert des univariaten Modells, der nun 12,5 % beträgt, konnte somit eine Verbesserung um einen Faktor von ungefähr zwei erzielt werden. Abgesehen davon lässt sich die Kombination aus SAM und MCR-ALS auch dann einsetzen, wenn die Banden des Analyten durch das Untergrundsignal der Probenmatrix überlagert wird. In diesem Fall versagt das einfache univariate Modell.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage nach der Notwendigkeit einer Untergrundkorrektur. Da die SAM Translationseffekte nicht kompensieren kann, ist unter Verwendung der Bandenflächen eine Untergrundkorrektur erforderlich. Die Ergebnisse hängen dabei stark von den Parametern des Korrekturalgorithmus ab. Im Fall der MCR-ALS kann hingegen mit den nichtkorrigierten Spektren arbeiten. Der Grund dafür ist die Zerlegung der Mischspektren in die spektralen Beiträge der beiden angenommenen Komponenten, anhand der Referenzspektren. Sofern jene Beiträge des Untergrundsignals, die sich über den gesamten Spektralbereich hin erstrecken (beispielsweise Fluoreszenz), hauptsächlich von der Probenmatrix stammen, werden sie demnach auch dieser Komponente zugeordnet und die Konzentrationsprofile der Analytkomponente sind (größtenteils) frei von Translationseffekten. Da bei der Durchführung einer Untergrundkorrektur grundsätzlich die Gefahr besteht, Artefakte in den Daten zu erzeugen, stellt dies einen weiteren Vorteil der MCR-ALS dar.

In der klinischen Praxis steht im Allgemeinen jedoch keine analytfreie Probe zur Verfügung, welche zur Messung eines Referenzspektrums für die Probenmatrix herangezogen werden könnte. Ein möglicher Lösungsansatz für diese Problematik ist die Abschätzung der spektralen Beiträge der einzelnen Komponenten des Probenge-

I. Einleitung

misches unter Zuhilfenahme statistischer Methoden, welche ohne Zusatzinformationen, abgesehen von der Anzahl der zu erwartenden Komponenten, anwendbar sind. Hierfür bieten sich Verfahren an, die den Datensatz nach jenen Zeilen oder Spalten durchsuchen, die sich durch höchstmögliche Verschiedenheit zueinander auszeichnen. Beispiele für diese sogenannten „Pure Variables“-Methoden sind der SIMPLISMA (*SIMPL*e-to-use *Interactive Selfmodeling Mixture Analysis*) sowie der OPA-Algorithmus (*orthogonal projection approach*) [80, 135, 136]. Anschließend können die daraus resultierenden Spektren als Startparameter für die MCR-ALS eingesetzt werden. Ein anderer Ansatz ist die Erstellung einer Datenbank auf der Grundlage von Urinproben einer repräsentativen Anzahl von Spendern. Die gesammelten Untergrundspektren dienen dann als Startparameter in einer Reihe von Durchläufen des Algorithmus. Anschließend werden die Konzentrationsprofile des Resultats mit der höchsten Korrelation zwischen der angepassten und der gemessenen Kurve für die SAM verwendet. Welches dieser Verfahren die robusteren Ergebnisse liefern kann wird Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.

3.3. Abschließende Bemerkungen

In den letzten beiden Jahrzehnten konnte das hohe Anwendungspotential der SERS-Spektroskopie für die Lebenswissenschaften vielfach unter Beweis gestellt werden. Dem Übergang zur Routineanalytik steht jedoch entgegen, dass die Gewährleistung reproduzierbarer Ergebnisse, insbesondere hinsichtlich quantitativer Fragestellungen, nach wie vor herausfordernd ist. Diese Problematik ist eng mit der Reproduzierbarkeit und Stabilität der verwendeten SERS-Substrate sowie der komplexen Wechselwirkung zwischen Analyt und Substratoberfläche verbunden. Darüber hinaus beeinträchtigt die Probenmatrix die Genauigkeit der Ergebnisse teilweise erheblich. Dieser Einfluss lässt sich experimentell nur bedingt reduzieren, weshalb der Einsatz geeigneter chemometrischer Methoden erforderlich ist.

Mit dem Ziel robuste, quantitative Analysen auf Basis der SERS-Spektroskopie zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche experimentelle Ansätze und chemometrische Methoden kombiniert. Ein wichtiger Punkt, der hierbei adressiert wurde, ist der Umgang mit den störenden Einflüssen der Probenmatrix. Für die Anwendungsbeispiele mit Bezug auf die Lebensmittelüberwachung wurde dabei auf planare Substrate zurückgegriffen, wohingegen für die klinischen Proben die LoC-SERS-Technik zum Einsatz kam. Ein wesentlicher Grund hierfür sind die unterschiedlichen Anforderungen an beide Anwendungen.

In der Lebensmittelanalytik sind handliche Geräte für Vor-Ort-Analysen favorisiert, deren Benutzung ohne entsprechende Fachausbildung möglich ist. Zudem spie-

len oft wasserunlösliche Analyten eine Rolle, die zunächst mittels organischer Lösungsmittel aus der Probe extrahiert werden. Planare Substrate lassen sich einfach handhaben, können als Verbrauchsmaterial produziert werden und eignen sich für polare wie unpolare Lösungsmittel. Die Wahl ist auf sogenannte FON- und EGNP-Strukturen gefallen, welche einen Kompromiss aus Reproduzierbarkeit und Kosteneffizienz darstellen. Um robustere Resultate erzielen zu können, wurden die Substrate, anstelle auf Punktmessungen zurückzugreifen, während der Messung räumlich abgerastert. Über eine Mittelung der Einzelmessungen lassen sich auf diese Weise negative Einflüsse durch lokale Schwankungen in den Nanostrukturen reduzieren. Im Fall der FON-Substrate konnte zudem das Signal des Silizium-Trägermaterials, auf dem die Struktur aufgebracht ist, als integrierter Signalstandard verwendet werden. Anhand des Farbstoffes Azorubin in kommerziell erhältlichen Süßgetränken konnte gezeigt werden, dass die SERS-Spektroskopie ein hohes Potential für quantitative Untersuchungen von Lebensmitteln aufweist. Obwohl sich die Probenvorbereitung lediglich auf die Verdünnung der Getränkeproben beschränkt, konnten vergleichbare Ergebnisse zur HPLC-DAD erzielt werden. Die Verwendung einzelner Banden zur Erstellung eines univariaten Kalibriermodells ist jedoch nur möglich, sofern die Überlagerung der Signale des Analyten und der Probenmatrix vernachlässigbar gering sind. Im Fall des Azorubins begünstigt die hohe Affinität der Farbstoffmoleküle zur Silberoberfläche die Detektion und der Einfluss der Zucker, die als wesentliche Störfaktoren der Probenmatrix ermittelt wurden, konnte durch die Verdünnung minimiert werden.

In den meisten anwendungsbezogenen Problemstellungen ist die Voraussetzung einer geringen Beeinflussung der Spektren durch die Probenmatrix jedoch nicht gegeben, wie das Beispiel des wasserunlöslichen Farbstoffs Sudan III in Paprikapulver verdeutlicht. Die Anlagerung des Analyten an der Silberoberfläche konnte durch eine hierfür entwickelte Oberflächenmodifikation begünstigt werden. Zeitgleich lassen sich auf diese Weise unerwünschte Beiträge der Probenmatrix reduzieren, wodurch der Nachweis des Farbstoffs ermöglicht wird. Die dennoch bestehende Überlagerung der Analytbanden durch Matrixbeiträge erschwert die Verwendung univariater Modelle erheblich. Deutlich zuverlässigere Resultate können mit dem hier vorgeschlagenen, kombinierten PCA-PLSR-Modell erzielt werden. Dieses lässt sich mit geringem Aufwand in eine automatisierte Datenvorbehandlung und -auswertung implementieren. Die hierzu in der Programmiersprache *GnuR* erstellten Funktionen ermöglichen eine nutzerfreundliche Vorbehandlung der Spektren, Modellbildung und Analyse unbekannter Proben. Zeitgleich reduziert die Automatisierung subjektive Einflüsse

I. Einleitung

auf die Auswertung und macht den Umgang mit großen Datensätzen, die aus den Rastermessungen folgen, möglich.

Die Verwendbarkeit des Modells ist dabei nicht auf Lebensmittelanwendungen beschränkt, wie anhand der TDM erfolgreich demonstriert werden konnte. In diesem klinisch relevanten Anwendungsgebiet gilt es vorrangig wasserlösliche Substanzen in Körperflüssigkeiten nachzuweisen. Daher lässt sich hier die hohe Sensitivität von Silberkolloiden in wässriger Lösung ausnutzen, wobei durch den Einsatz der LoC-SERS-Technik automatisierte Messreihen unter wohldefinierten Bedingungen durchgeführt werden können. Einerseits erhöht sich dadurch die Signalstabilität und somit die Genauigkeit der Ergebnisse und andererseits wird der Arbeitsaufwand in klinischen Laboratorien sowie der Zeitbedarf für die Analyse reduziert. Zusätzlich lässt sich die Reproduzierbarkeit unabhängiger Messungen erhöhen, indem zur Herstellung der Silberkolloide das Protokoll von Leopold und Lendl, anstatt des zumeist verwendeten Lee-Meisel-Protokolls, eingesetzt wird. Die im Vergleich höhere Chargenvergleichbarkeit und Lagerstabilität wirken sich zudem positiv auf den praktischen Umgang mit den daraus resultierenden Kolloiden aus.

Durch die Kombination der LoC-SERS-Technik mit dem PCA-PLSR-Modell konnte die Konzentration des Antibiotikums LVX in Urin, mit hinreichender Genauigkeit in einem therapeutisch relevanten Bereich, bestimmt werden. Dabei wurde gezeigt, dass unabhängige Datensätze, die an verschiedenen Tagen gemessen wurden, als Trainings- und Testdatensatz verwendet werden können. Dies spricht für die Stabilität der experimentellen Bedingungen gleichermaßen wie für die Robustheit der Datenanalyse. Deweiteren konnte erfolgreich demonstriert werden, dass der aufwändige Laboraufbau durch ein tragbares Mikrospektrometer ersetzt werden kann. Trotz des geringeren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der daraus erhaltenen Daten, erlaubt die vorgestellte Auswerteroutine eine zuverlässige Quantifizierung des Antibiotikums. Die hohe Diversität der Urinproben und die damit verbundene Varianz der Untergrundspektren von Probe zu Probe erschwert jedoch die Übertragbarkeit von Kalibriermodellen. Aus diesem Grund wurde für die Quantifizierung von NTX in Urin die SAM als Alternative zur Kalibrierung getestet. Die der Methode zugrundeliegende univariate lineare Regression wurde dabei auf der Grundlage der Fläche einer einzelnen Markerbanden sowie der MCR-ALS, einer Technik der multivariaten Statistik zur Auftrennung von Mischspektren, durchgeführt. Obwohl die verwendete Markerbande nur geringfügig durch die Signale der Probenmatrix gestört wird, konnte im Fall der MCR-ALS, durch die Extraktion von Informationen aus einem größeren spektralen Bereich, der relative Fehler reduziert und somit die genaueren Resultate erzielt werden.

Für die Quantifizierung wasserlöslicher Substanzen in einer komplexen Probenmatrix bietet die LoC-SERS-Technik in Kombination mit einer automatisierten Analyse auf Basis multivariater Methoden einen vielversprechenden Ansatz. Das zweistufige PCA-PLSR-Kalibriermodell liefert zuverlässige Ergebnisse für geringfügig in ihrer Zusammensetzung schwankende Probenmatrizen. Liegen stattdessen stark variierende Proben vor, bildet die SAM unter Verwendung der MCR-ALS eine Alternative mit hohem Anwendungspotential. Der LoC-SERS-Ansatz ermöglicht hierbei eine nutzerfreundliche Umsetzung des Verfahrens, da die benötigten Konzentrationsserien automatisch generiert und vermessen werden können. Auf diese Weise lässt sich die Messung der Proben sowie die Auswertung der gewonnenen Daten weitestgehend automatisieren. Im Fall wasserunlöslicher Substanzen ist die Verwendung kostengünstiger, planarer Strukturen für den Einmalgebrauch zu bevorzugen. Der Einfluss der Probenmatrix auf die gemessenen Spektren kann hierbei durch eine gezielte Oberflächenmodifizierung der verwendeten Nanostrukturen reduziert werden. Zudem gewährleistet das vorgestellte PCA-PLSR-Modell auch hier die quantitative Untersuchung einzelner Probenbestandteile trotz störender Beiträge durch die Probenmatrix.

In zukünftigen Arbeiten gilt es die Fragestellung nach den benötigten Referenzspektren zur Initialisierung der MCR-ALS zu adressieren. Hierfür könnten statistische Methoden zur Abschätzung der spektralen Einzelbeiträge sowie Referenzdatenbanken zum Einsatz kommen. Darüber hinaus bieten andere Ansätze, wie die Kombination der SAM mit der PLSR, ebenfalls interessante Perspektiven für quantitativen Anwendungen. Die nächsten Schritte im Fall planarer Strukturen stellt die Erprobung transportabler Messaufbauten für Feldeinsätze dar. Zudem würde die Verwendung der SAM auch hier deutliche Vorteile mit sich bringen. Hierzu müssen praktikable Ansätze zur Durchführung der SAM auf Basis planarer Substrate entwickelt und getestet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] J.-S. Kang and M.-H. Lee, The Korean Journal of Internal Medicine **24**, 1 (2009).
- [2] I. Baranowska, S. Magiera, and J. Baranowski, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **927**, 54 (2013).
- [3] G. Brandhorst, M. Oellerich, G. Maine, P. Taylor, G. Veen, and P. Wallemacq, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **58**, 821 (2012).
- [4] R. Rebane, I. Leito, S. Yurchenko, and K. Herodes, Journal of Chromatography A **1217**, 2747 (2010).
- [5] D. M. Muller and K. M. Rentsch, Analytical and Bioanalytical Chemistry **398**, 2573 (2010).
- [6] D. Wild, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)* (Elsevier, Oxford, 2013) pp. 7–10.
- [7] F. Siebert and P. Hildebrandt, *Vibrational Spectroscopy in Life Science*, Tutorials in Biophysics (Wiley, 2008).
- [8] J. Popp, C. Krafft, and T. Mayerhöfer, Optik & Photonik **6**, 24 (2011).
- [9] D. Yang and Y. Ying, Applied Spectroscopy Reviews **46**, 539 (2011).
- [10] K. Kong, C. Kendall, N. Stone, and I. Nottingher, Advanced Drug Delivery Reviews **89**, 121 (2015).
- [11] S. Wartewig and R. H. Neubert, Advanced Drug Delivery Reviews **57**, 1144 (2005).
- [12] D. Sun, *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* (Academic Press, 2009).
- [13] G. Bellisola and C. Sorio, American Journal of Cancer Research **2**, 1 (2011).

- [14] D. A. Long, “Survey of light-scattering phenomena,” in *The Raman Effect* (John Wiley & Sons, Ltd, 2002) pp. 3–18.
- [15] J. Popp and W. Kiefer, “Raman scattering, fundamentals,” in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (John Wiley & Sons, Ltd, 2006) pp. 13104–1314.
- [16] E. V. Efremov, F. Ariese, and C. Gooijer, *Analytica Chimica Acta* **606**, 119 (2008).
- [17] M. Schmitt and J. Popp, *J. Raman Spectrosc.* **37**, 20 (2006).
- [18] S. M. Morton, D. W. Silverstein, and L. Jensen, *Chemical Reviews*, *Chem. Rev.* **111**, 3962 (2011).
- [19] S. Schlücker, *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 4756 (2014).
- [20] E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin, in *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* (Elsevier, Amsterdam, 2009) pp. 299–365.
- [21] E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin, in *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* (Elsevier, Amsterdam, 2009) pp. 121–183.
- [22] B. Sharma, R. R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, and R. P. Van Duyne, **15**, 16 (2012).
- [23] W. Xie and S. Schlücker, *Reports on Progress in Physics* **77**, 116502 (2014).
- [24] A. Grubisic, E. Ringe, C. M. Cobley, Y. Xia, L. D. Marks, R. P. Van Duyne, and D. J. Nesbitt, *Nano Letters*, *Nano Lett.* **12**, 4823 (2012).
- [25] Y. Bao, Y. Hou, and Z. Wang, *Plasmonics* **10**, 251 (2015).
- [26] L. Jensen, C. M. Aikens, and G. C. Schatz, *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1061 (2008).
- [27] N. Valley, N. Greeneltch, R. P. Van Duyne, and G. C. Schatz, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 2599 (2013).
- [28] M. Moskovits and J. S. Suh, *J. Phys. Chem.* **88**, 5526 (1984).
- [29] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783 (1985).
- [30] E. C. Le Ru, S. A. Meyer, C. Artur, P. G. Etchegoin, J. Grand, P. Lang, and F. Maurel, *Chem. Commun.* **47**, 3903 (2011).

- [31] D. Cialla, J. Petschulat, U. Hübner, H. Schneidewind, M. Zeisberger, R. Mattheis, T. Pertsch, M. Schmitt, R. Möller, and J. Popp, *ChemPhysChem* **11**, 1918 (2010).
- [32] C. M. Aikens, L. R. Madison, and G. C. Schatz, *Nat Photon* **7**, 508 (2013).
- [33] M. J. Natan, *Faraday Discuss.* **132**, 321 (2006).
- [34] D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, and J. Popp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 27 (2012).
- [35] Y. Zhang, W. Yu, L. Pei, K. Lai, B. A. Rasco, and Y. Huang, *Food Chemistry* **169**, 80 (2015).
- [36] C. Muehlethaler, M. Leona, and J. R. Lombardi, *Analytical Chemistry*, **88**, 152 (2016).
- [37] S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu, *Chemical Society Reviews* **37**, 1012 (2008).
- [38] Y. Zhang, B. Walkenfort, J. H. Yoon, S. Schlücker, and W. Xie, **17**, 21120 (2015).
- [39] K. R. Ackermann, T. Henkel, and J. Popp, *ChemPhysChem* **8**, 2665 (2007).
- [40] K. R. Strehle, D. Cialla, P. Rösch, T. Henkel, M. Köhler, and J. Popp, *Analytical Chemistry, Anal. Chem.* **79**, 1542 (2007).
- [41] I. J. Hidi, M. Jahn, K. Weber, T. W. Bocklitz, M. W. Pletz, D. Cialla-May, and J. Popp, *Analytical Chemistry* **88**, 9173 (2016).
- [42] R. Gao, N. Choi, S.-I. Chang, E. K. Lee, and J. Choo, *Nanoscale* **6**, 8781 (2014).
- [43] V. Dugandzic, I. J. Hidi, K. Weber, D. Cialla-May, and J. Popp, *Analytica Chimica Acta* **946**, 73 (2016).
- [44] D. M. Zhang, Y. Xie, S. K. Deb, V. J. Davison, and D. Ben-Amotz, *Analytical Chemistry* **77**, 3563 (2005).
- [45] R. Stosch, A. Henrion, D. Schiel, and B. Guttler, *Analytical Chemistry* **77**, 7386 (2005).
- [46] A. März, K. R. Ackermann, D. Malsch, T. Bocklitz, T. Henkel, and J. Popp, *J. Biophoton.* **2**, 232 (2009).

- [47] P. N. Perera, S. K. Deb, V. J. Davisson, and D. Ben-Amotz, *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, 752 (2010).
- [48] S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu, *Analyst* **129**, 1032 (2004).
- [49] S. E. J. Bell, J. N. Mackle, and N. M. S. Sirimuthu, *Analyst* **130**, 545 (2005).
- [50] T. H. Xia, Z. P. Chen, Y. Chen, J. W. Jin, and R. Q. Yu, *Analytical Methods* **6**, 2363 (2014).
- [51] P. Joshi, Y. Zhou, T. O. Ahmadov, and P. Zhang, *Journal of Materials Chemistry C* **2**, 9964 (2014).
- [52] A. M. Fales and V. D. Tuan, *Journal of Materials Chemistry C* **3**, 7319 (2015).
- [53] W. Shen, X. Lin, C. Jiang, C. Li, H. Lin, J. Huang, S. Wang, G. Liu, X. Yan, Q. Zhong, and B. Ren, *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7308 (2015).
- [54] Y. Zhou, R. Ding, P. Joshi, and P. Zhang, *Analytica Chimica Acta* **874**, 49 (2015).
- [55] E. Kämmer, K. Olschewski, T. Bocklitz, P. Rösch, K. Weber, D. Cialla, and J. Popp, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 9056 (2014).
- [56] T. Y. Jeon, D. J. Kim, S.-G. Park, S.-H. Kim, and D.-H. Kim, *Nano Convergence* **3**, 18 (2016).
- [57] H.-Y. Chen, M.-H. Lin, C.-Y. Wang, Y.-M. Chang, and S. Gwo, *Journal of the American Chemical Society*, *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 13698 (2015).
- [58] M. Jahn, S. Patze, I. J. Hidi, R. Knipper, A. I. Radu, A. Mühlig, S. Yüksel, V. Peksa, K. Weber, T. Mayerhöfer, *et al.*, *Analyst* **141**, 756 (2016).
- [59] K. Kim, H. B. Lee, H. K. Park, and K. S. Shin, *Journal of Colloid and Interface Science* **318**, 195 (2008).
- [60] V. Peksa, M. Jahn, L. Štolcová, V. Schulz, J. Proška, M. Procházka, K. Weber, D. Cialla-May, and J. Popp, *Analytical chemistry* **87**, 2840 (2015).
- [61] L. Mikoliunaite, R. D. Rodriguez, E. Sheremet, V. Kolchuzhin, J. Mehner, A. Ramanavicius, and D. R. T. Zahn, *Scientific Reports* **5**, 13150 (2015).
- [62] A. Lorén, J. Engelbrektsson, C. Eliasson, M. Josefson, J. Abrahamsson, M. Johansson, and K. Abrahamsson, *Analytical Chemistry*, *Anal. Chem.* **76**, 7391 (2004).

- [63] O. Lyandres, N. C. Shah, C. R. Yonzon, J. T. Walsh, M. R. Glucksberg, and R. P. Van Duyne, *Analytical Chemistry*, Anal. Chem. **77**, 6134 (2005).
- [64] O. Lyandres, J. M. Yuen, N. C. Shah, R. P. VanDuyne, J. T. Walsh, and M. R. Glucksberg, *Diabetes Technology & Therapeutics* **10**, 257 (2008).
- [65] N. C. Shah, O. Lyandres, J. T. Walsh, M. R. Glucksberg, and R. P. Van Duyne, *Analytical Chemistry*, Anal. Chem. **79**, 6927 (2007).
- [66] B. Sharma, P. Bugga, L. R. Madison, A.-I. Henry, M. G. Blaber, N. G. Greeneltch, N. Chiang, M. Mrksich, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne, *Journal of the American Chemical Society*, J. Am. Chem. Soc. **138**, 13952 (2016).
- [67] F. Sun, T. Bai, L. Zhang, J.-R. Ella-Menye, S. Liu, A. K. Nowinski, S. Jiang, and Q. Yu, *Analytical Chemistry*, Anal. Chem. **86**, 2387 (2014).
- [68] F. Sun, J.-R. Ella-Menye, D. D. Galvan, T. Bai, H.-C. Hung, Y.-N. Chou, P. Zhang, S. Jiang, and Q. Yu, *ACS Nano*, ACS Nano **9**, 2668 (2015).
- [69] K. T. Carron and B. J. Kennedy, *Analytical Chemistry*, Anal. Chem. **67**, 3353 (1995).
- [70] B. J. Kennedy, R. Milofsky, and K. T. Carron, *Analytical Chemistry*, Anal. Chem. **69**, 4708 (1997).
- [71] X. Jiang, M. Yang, Y. Meng, W. Jiang, and J. Zhan, *ACS Applied Materials & Interfaces*, ACS Appl. Mater. Interfaces **5**, 6902 (2013).
- [72] T. Bocklitz, A. Walter, K. Hartmann, P. Rösch, and J. Popp, *Analytica Chimica Acta* **704**, 47 (2011).
- [73] R. L. McCreery, in *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis* (John Wiley & Sons, Inc., 2005) pp. 49–71.
- [74] N. Kourkoumelis, A. Polymeros, and M. Tzaphlidou, *Spectroscopy: An International Journal* **27**, 441 (2012).
- [75] S. Stöckel, A. Walter, A. Boßecker, S. Meisel, V. Ciobota, W. Schumacher, P. Rösch, and J. Popp, in *Handbook of Biophotonics* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012).
- [76] M. Natrella, *NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods*, edited by C. Croarkin, P. Tobias, J. Filliben, B. Hembree, W. Guthrie, L. Trutna, and J. Prins (NIST/SEMATECH, 2010).

- [77] R. Wehrens, in *Chemometrics with R: Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences*, edited by R. Wehrens (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011) pp. 145–172.
- [78] P. Geladi and B. R. Kowalski, *Analytica Chimica Acta* **185**, 1 (1986).
- [79] R. Wehrens, in *Chemometrics with R: Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences*, edited by R. Wehrens (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011) pp. 43–66.
- [80] A. de Juan, J. Jaumot, and R. Tauler, *Anal. Methods* **6**, 4964 (2014).
- [81] A. de Juan, S. C. Rutan, and R. Tauler, in *Comprehensive Chemometrics* (Elsevier, Oxford, 2009) pp. 325–344.
- [82] S. L. R. Ellison and M. Thompson, *Analyst* **133**, 992 (2008).
- [83] M. Thompson and S. L. R. Ellison, *Accreditation and Quality Assurance* **10**, 82 (2005).
- [84] J. Zheng and L. He, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**, 317 (2014).
- [85] H. Fang, X. Zhang, S. J. Zhang, L. Liu, Y. M. Zhao, and H. J. Xu, *Sensors and Actuators B: Chemical* **213**, 452 (2015).
- [86] A. Radu, Y. Y. Ussembayev, M. Jahn, U. Schubert, K. Weber, D. Cialla-May, S. Hoeppe, A. Heisterkamp, and J. Popp, *RSC Advances* **6**, 44163 (2016).
- [87] C. Fan, Z. Hu, A. Mustapha, and M. Lin, *Applied Microbiology and Biotechnology* **92**, 1053 (2011).
- [88] Y. Wang, S. Ravindranath, and J. Irudayaraj, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**, 1271 (2011).
- [89] X. Wu, C. Xu, R. A. Tripp, Y.-w. Huang, and Y. Zhao, *Analyst* **138**, 3005 (2013).
- [90] Y. Zhang, Y. Huang, F. Zhai, R. Du, Y. Liu, and K. Lai, *Food Chemistry* **135**, 845 (2012).
- [91] C. Müller, L. David, V. Chis, and S. C. Pinzaru, *Food Chemistry* **145**, 814 (2014).

- [92] H. Luo, Y. Huang, K. Lai, B. A. Rasco, and Y. Fan, *Food Control* **68**, 229 (2016).
- [93] C. Yao, F. Cheng, C. Wang, Y. Wang, X. Guo, Z. Gong, M. Fan, and Z. Zhang, *Anal. Methods* **5**, 5560 (2013).
- [94] Y. Zhang, Z. Wang, L. Wu, Y. Pei, P. Chen, and Y. Cui, *Analyst* **139**, 5148 (2014).
- [95] X.-F. Zhang, M.-Q. Zou, X.-H. Qi, F. Liu, X.-H. Zhu, and B.-H. Zhao, *J. Raman Spectrosc.* **41**, 1655 (2010).
- [96] N. N. Yazgan, I. H. Boyaci, A. Topcu, and U. Tamer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 2009 (2012).
- [97] Y. Hu, S. Feng, F. Gao, E. C. Y. Li-Chan, E. Grant, and X. Lu, *Food Chemistry* **176**, 123 (2015).
- [98] Y. Hu and X. Lu, *Journal of Food Science* **81**, N1272 (2016).
- [99] L. Chen, L. Luo, Z. Chen, M. Zhang, J. A. Zapien, C. S. Lee, and S. T. Lee, *The Journal of Physical Chemistry C*, *J. Phys. Chem. C* **114**, 93 (2010).
- [100] Y. Cheng and Y. Dong, *Food Control* **22**, 685 (2011).
- [101] M. Lin, L. He, J. Awika, L. Yang, D. R. Ledoux, H. Li, and A. Mustapha, *Journal of Food Science* **73**, T129 (2008).
- [102] L. C. Mecker, K. M. Tyner, J. F. Kauffman, S. Arzhantsev, D. J. Mans, and C. M. Grynewicz-Ruzicka, *Analytica Chimica Acta* **733**, 48 (2012).
- [103] Y. Zhao, W. Luo, P. Kanda, H. Cheng, Y. Chen, S. Wang, and S. Huan, *Talanta* **113**, 7 (2013).
- [104] F. Gao, Y. Hu, D. Chen, E. C. Y. Li-Chan, E. Grant, and X. Lu, *Talanta* **143**, 344 (2015).
- [105] L. Pei, Y. Ou, W. Yu, Y. Fan, Y. Huang, and K. Lai, *Journal of Nanomaterials* **2015**, 8 (2015).
- [106] S. He, W. Xie, W. Zhang, L. Zhang, Y. Wang, X. Liu, Y. Liu, and C. Du, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **137**, 1092 (2015).

- [107] C. V. Di Anibal, L. F. Marsal, M. P. Callao, and I. Ruisánchez, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **87**, 135 (2012).
- [108] B. Liu, P. Zhou, X. Liu, X. Sun, H. Li, and M. Lin, *Food and Bioprocess Technology* **6**, 710 (2013).
- [109] A. Jaworska, S. Fornasaro, V. Sergo, and A. Bonifacio, *Biosensors*, *Biosensors* **6**, 1 (2016).
- [110] A. März, S. Trupp, P. Rösch, G. J. Mohr, and J. Popp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 2625 (2012).
- [111] Y. Xie, X. Zhu, Y. Sun, H. Wang, H. Qian, and W. Yao, *European Food Research and Technology* **235**, 555 (2012).
- [112] M. B. Mamián-López and R. J. Poppi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 7671 (2013).
- [113] K. S. McKeating, M. Couture, M.-P. Dinel, S. Garneau-Tsodikova, and J.-F. Masson, *Analyst* **141**, 5120 (2016).
- [114] C. McLaughlin, D. MacMillan, C. McCardle, and W. E. Smith, *Analytical Chemistry*, *Anal. Chem.* **74**, 3160 (2002).
- [115] C. J. Choi, H.-Y. Wu, S. George, J. Weyhenmeyer, and B. T. Cunningham, *Lab Chip* **12**, 574 (2012).
- [116] H.-Y. Wu and B. T. Cunningham, *Nanoscale* **6**, 5162 (2014).
- [117] S. Fornasaro, S. D. Marta, M. Rabusin, A. Bonifacio, and V. Sergo, *Faraday Discuss.* **187**, 485 (2016).
- [118] J. E. L. Villa and R. J. Poppi, *Analyst* **141**, 1966 (2016).
- [119] W. W. Y. Lee, C. P. McCoy, R. F. Donnelly, and S. E. J. Bell, *Analytica Chimica Acta* **912**, 111 (2016).
- [120] C. Yuen, W. Zheng, and Z. Huang, *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 580 (2010).
- [121] O. Alharbi, Y. Xu, and R. Goodacre, *Analyst* **139**, 4820 (2014).
- [122] E. Kämmer, K. Olschewski, S. Stöckel, P. Rösch, K. Weber, D. Cialla-May, T. Bocklitz, and J. Popp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 8925 (2015).

- [123] J. Palacký, P. Mojzeš, and J. Bok, *J. Raman Spectrosc.* **42**, 1528 (2011).
- [124] A. Esme and S. G. Sagdinc, *Journal of Molecular Structure* **1048**, 185 (2013).
- [125] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2016).
- [126] B.-H. Mevik, R. Wehrens, and K. H. Liland, *pls: Partial Least Squares and Principal Component Regression* (2016), r package version 2.6-0.
- [127] K. Gray, M. Walker, M. Burn, M. Mazur, K. Niedzwiedzka, K. Lizka, and D. Thorburn Burns, *Journal of the Association of Public Analysts* **44**, 018 (2016).
- [128] S. J. Lehotay, in *Pesticide Protocols* (Humana Press, Totowa, NJ, 2006) pp. 239–261.
- [129] P. C. Lee and D. Meisel, *The Journal of Physical Chemistry*, *J. Phys. Chem.* **86**, 3391 (1982).
- [130] N. Leopold and B. Lendl, *The Journal of Physical Chemistry B*, *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723 (2003).
- [131] M. Morhac, *Peaks: Peaks* (2012), r package version 0.2.
- [132] J. Curran and W. Bolstad, *Bolstad: Bolstad functions* (2016), r package version 0.2-33.
- [133] F. M. E. Wagenlehner, M. Kinzig-Schippers, U. Tischmeyer, C. Wagenlehner, F. Sörgel, A. Dalhoff, and K. G. Naber, *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**, 7 (2006).
- [134] K. M. Mullen, *ALS: Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares (MCR-ALS)* (2015), r package version 0.0.6.
- [135] W. Windig and J. Guilment, *Anal. Chem.* **63**, 1425 (1991).
- [136] K. De Braekeleer and D. L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **39**, 127 (1997).

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

1. Publikationen

Das folgende Kapitel beinhaltet die Nachdrucke, der in dieser Dissertation präsentierten Publikationen. Einzelheiten zu den Urheberrechten sind auf der jeweiligen Titelseite angegeben.

1.1. Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks [VP]

Vlastimil Peksa, Martin Jahn, Lucie Štolcová, Volker Schulz, Jan Proška, Marek Procházka, Karina Weber, Dana Cialla-May und Jürgen Popp

Anal. Chem., 2015, 87, 2840 – 2844

Reprinted with kind permission from the American Chemical Society,
Copyright © 2015.

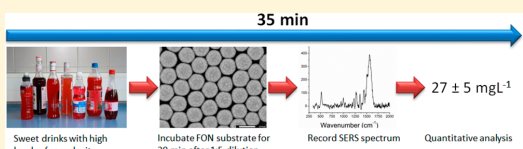
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac504254k>

Quantitative SERS Analysis of Azorubine (E 122) in Sweet Drinks

Vlastimil Peksa,[†] Martin Jahn,^{‡,§} Lucie Štolcová,^{||} Volker Schulz,[⊥] Jan Proška,^{||} Marek Procházka,[†] Karina Weber,^{‡,§} Dana Cialla-May,^{*,‡,§} and Jürgen Popp^{‡,§}[†]Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague, Ke Karlovu 5, 121 16 Prague 2, Czech Republic[‡]Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich-Schiller-University Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany[§]Leibniz Institute of Photonics Technology (IPHT), Albert-Einstein-Strasse 9, 07745, Jena, Germany^{||}Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University in Prague, Břehová 7, 11519 Praha 1, Czech Republic[⊥]Food GmbH Jena, Analytik Consulting, Orlaweg 2, 07743, Jena, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Considering both the potential effects on human health and the need for knowledge of food composition, quantitative detection of synthetic dyes in foodstuffs and beverages is an important issue. For the first time, we report a fast quantitative analysis of the food and drink colorant azorubine (E 122) in different types of beverages using surface-enhanced Raman scattering (SERS) without any sample preparation. Seven commercially available sweet drinks (including two negative controls) with high levels of complexity (sugar/artificial sweetener, ethanol content, etc.) were tested. Highly uniform Au “film over nanospheres” (FON) substrates together with use of Raman signal from silicon support as internal intensity standard enabled us to quantitatively determine the concentration of azorubine in each drink. SERS spectral analysis provided sufficient sensitivity (0.5–500 mg L⁻¹) and determined azorubine concentration closely correlated with those obtained by a standard HPLC technique. The analysis was direct without the need for any pretreatment of the drinks or Au surface. Our SERS approach is a simple and rapid (35 min) prescan method, which can be easily implemented for a field application and for preliminary testing of food samples.



1. INTRODUCTION

Food colorants (synthetic or natural) are added to food and drinks to increase their visual attractiveness to consumers and to restore their original appearance when it has been lost during production processes. However, some of the additive colorants represent a potential risk to human health, especially in the case of excessive consumption. For that reason, the presence of synthetic colorants in foods and drinks is rigidly controlled by legislation in many countries. Azorubine (Carmoisine, Food red 3 or E 122 in Europe, disodium 4-hydroxy-3-((4-sulphonatonaphthyl)azo) naphthalenesulfonate, CAS number 3567-69-9), studied here, is widely used as an artificial food and drink additive. It appears as a reddish-maroon powder. Azorubine has been studied for possible effects on human health due to the unavoidable presence of carcinogenic β -naphthylamine¹ and its influence on human behavior, causing hyperactivity in children.² Among its other side effects on human health are the inhibition of cholinesterase,³ skin rash, and breathing difficulties.⁴ Also, a decrease of hemoglobin in the blood or adrenal gland hyperplasia⁵ has been reported. Its presence in food is therefore banned (e.g., in the United States and Japan) or limited in many countries. In the European Union, azorubine is a permitted food colorant with a maximum

use level up to 50–500 mg/kg, depending on food or drink type, according to Commission Regulations 1129/2011⁶ and 232/2012.⁷ Specifically, it is allowed in nonalcoholic flavored drinks at levels up to 50 mg L⁻¹ and in alcoholic drinks up to 200 mg L⁻¹.

From a strictly chemical point of view, drinks are complex mixtures and, as such, must be treated in the process of standardized chemical analysis. Identification and quantification of drink colorants should therefore be preceded by separation of components and their subsequent determination. The most widely employed techniques are high-performance liquid chromatography (HPLC),⁸ high-performance ion chromatography,⁹ or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).¹⁰ Such approaches require large-scale laboratory equipment and are costly and time-consuming and, therefore, are not suitable for point-of-care testing.

In the case of mass-produced beverages and alcoholic drinks, ad-hoc methodology based on surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy can be employed for sensitive

Received: November 13, 2014

Accepted: February 9, 2015

Published: February 9, 2015

sensing of additive colorants.¹¹ Raman scattering (RS) spectroscopy provides a “spectral fingerprint”, a unique molecular spectral patterns by which the molecule can be clearly identified. SERS is based on a giant RS enhancement (above 10^6) for molecules adsorbed onto a suitable nanostructured metal substrate.¹² SERS thus combines molecular fingerprint specificity and high sensitivity enabling a variety of applications including sensing.^{13–18} SERS molecular sensing from complex matrix can be hampered by poor efficiency and selectivity of the SERS surface to capture the target analyte. Functionalization of the metal surface by selective coatings can solve this problem,^{13–18} but it introduces another step in the analysis. On the other hand, if the affinity of the target analyte is substantially higher to overcome other components from the mixture, its selective adsorption can be achieved directly. To summarize, the SERS spectrum provides qualitative information about the presence of a particular analyte on the metal surface and gives information about its quantity. To eliminate problems connected with experimental factors, such as laser power fluctuations, focusing, drift in the optical alignment, and positioning of the substrate, an internal intensity standard¹⁹ is implemented in SERS quantitative analysis.

The rational design of metal substrates providing a large and uniform SERS enhancement is necessary for SERS quantitative sensing.^{20,21} It can be intrinsically ensured at periodic surfaces fabricated by nanosphere lithography.²² The metal “film over nanospheres” (FON) is formed from polystyrene or silica micro- or nanospheres self-assembled on a solid support and then sputtered with metal. The shape, size, and spacing of the nanostructures can be controlled by the size of nanospheres and the thickness of deposited metal.²³ Owing to their excellent spectral reproducibility, they were successfully employed in SERS sensing of small molecules such as glucose and biowarfare agents.^{22,24}

Within this contribution, a highly reproducible FON surface is applied for the detection of azorubine in different commercially available beverages, regardless of the alcohol content or different sweetening agents (i.e., sugar, artificial sweetener, or monosaccharides). A comparison of the method with HPLC is made, demonstrating the potential of SERS in quantitative food analysis and the negligibility of influence due to the competition of different adsorbates from the beverages’ complex matrixes.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. FON Fabrication. Polystyrene spherical beads (107 nm diameter) in aqueous dispersion (microParticles GmbH) were diluted with ethanol (1:1 v/v) and deposited onto water surface using a glass pipet, as described by Kosiorsek et al.²⁵ There, they formed monolayers with hexagonal close-packed ordering, which were then transferred onto cleaned silicon substrates and left to dry. Then, 20 nm of gold was deposited onto the monolayer by magnetron sputtering using a high-resolution sputter coater (Figure 1).

2.2. SERS Detection. The pure azorubine SERS measurement was carried out by incubating the Au substrates in azorubine aqueous solution for 30 min; then, they were removed from the solution, and the excess analyte was cleared away with an air stream. Drink specimens were purchased in stores in Germany and Czech Republic. The treatment of the drink samples for SERS measurement included 1:5 dilution with distilled water. The Au substrates were then incubated in

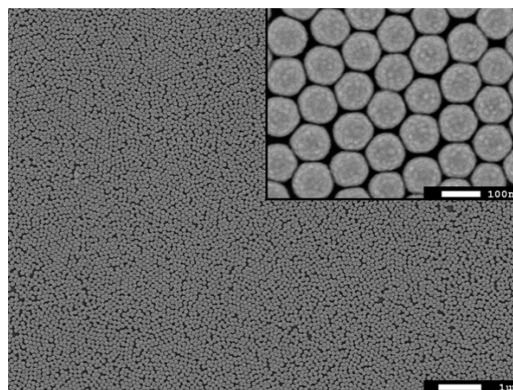


Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) image of Au FON prepared by self-assembly of 107 nm polystyrene beads covered with 20 nm gold layer.

the samples for 30 min, and after their removal, the remaining liquid was cleared away using an air stream.

SERS spectra were obtained using a WITec micro-Raman spectrometer equipped with a 632.8 nm line of He–Ne laser (1 mW laser power at the substrate) and a 50 \times objective lens. The SERS spectra were recorded as a set of 1 s scans from three 10×10 points square maps with the side of 50 μm . Two substrates were always used, and thus, data analysis included 600 SERS spectra per sample. The data processing included background subtraction using the method described by Palacký et al.²⁶ The peaks at 520 and 1356 cm^{-1} were fitted to Lorentz curves, and the area of these curves was determined using the midpoint integration method in OriginPro software. The ratio between these areas was plotted against the respective concentration, and then the OriginPro linear regression routine (weighted for the standard deviation of each of the ratios) was used to obtain the equation of the line. The reproducibility of the signal was calculated as relative standard deviation (RSD) of the ratio. The estimated limit of detection is 0.2 mg L^{-1} (Figure S1, Supporting Information), although the uncertainty in the low concentration range is more than 30%. Normal Raman spectra of azorubine powder (Sigma-Aldrich) were acquired by employing the 785 nm line (0.1 mW laser power at the sample) of a diode laser.

2.3. HPLC Detection. The drinks were diluted with purified water and passed through 0.45 μm syringe filters. Dilutions from 1:1 to 1:100 were prepared to achieve optimal HPLC signals. These solutions were injected directly into the HPLC-System. Calibration standards in purified water ranging from 1.0 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were used to calculate sample concentrations. The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-20AT binary gradient system with DGU-20A3 degassing unit, SIL-10AF autosampler, CTO-20AC column oven and SPD-M20A diode array detector. The injection volume was 20 μL and the separation was performed on a 250 \times 4.6 mm Vydac 201TP54 column. The mobile phase consisted of purified water (TKA system, solvent A) and acetonitrile (Promochem, solvent B). The total flow was 1.0 mL min^{-1} , and the column temperature was adjusted to 30 $^{\circ}\text{C}$. The gradient program started isocratically with 0% solvent B. After 5 min, a linear gradient was applied up to 80% solvent B (20 min) followed by a constant period (25 min) and finished with

the starting conditions (0% B, 35 min). The peaks were evaluated at three different wavelengths from the DAD spectrum; at 500, 519, and 550 nm. Concentrations from all three wavelengths and different dilutions were compared and averaged for the final result. The limit of quantification (LOQ) of this HPLC-DAD method determined with blank samples was 0.1 mg L^{-1} .

3. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we prepared a set of 34 Au FON substrates consisting of 20 nm thick gold layer sputtered on a self-assembled monolayer of polystyrene spherical beads deposited on a silicon wafer (Figure 1). Polystyrene beads do not reveal a perfect close-packed arrangement. However, packing defects are negligible with regard to the measuring laser spot with a diameter about $1 \mu\text{m}$, whereas the sphere diameter is 107 nm. The substrates are highly uniform, showing RSD of the azorubine SERS intensity up to 15%, and have a shelf lifetime in a time scale of months (Figure 2 top). The normal Raman

concentrated aqueous solutions. The comparison with the azorubine powder spectrum (Figure S2, Supporting Information) and literature^{27,28} indicates that 1225, 1275, 1356, 1441, and 1507 cm^{-1} bands in SERS spectra (Figure 3 top, spectrum

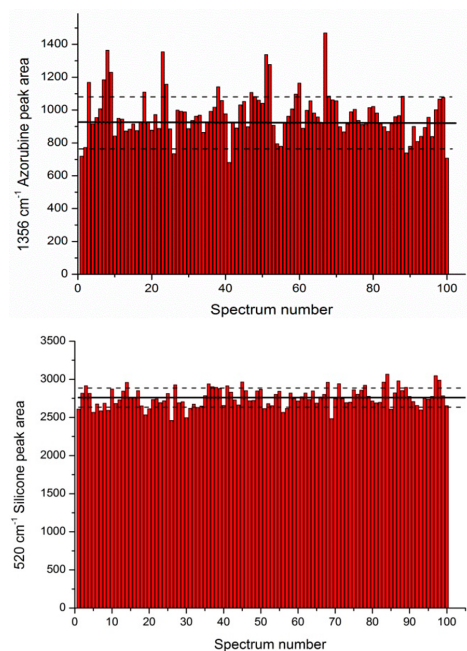


Figure 2. (Top) Stability of 1356 cm^{-1} azorubine peak within a single map from a substrate incubated in 2.5 mg L^{-1} azorubine solution. (Bottom) Stability of 520 cm^{-1} Si peak within a single map. The relative standard deviation (RSD) of silicon peak intensity is 4%, RSD of azorubine is 15%.

signal intensity from the silicon peak at 520 cm^{-1} varies by only 4% in single maps (Figure 2 bottom). This therefore ensures a good reliability to use it as the internal intensity standard.¹⁹ Although it cannot assess possible fluctuations in local SERS enhancement, such issues can be effectively countered by mapping of several larger areas.

To plot a calibration curve (SERS intensity versus azorubine concentration), we acquired SERS spectra of azorubine adsorbed on Au FON substrates from 0.5 to 500 mg L^{-1}

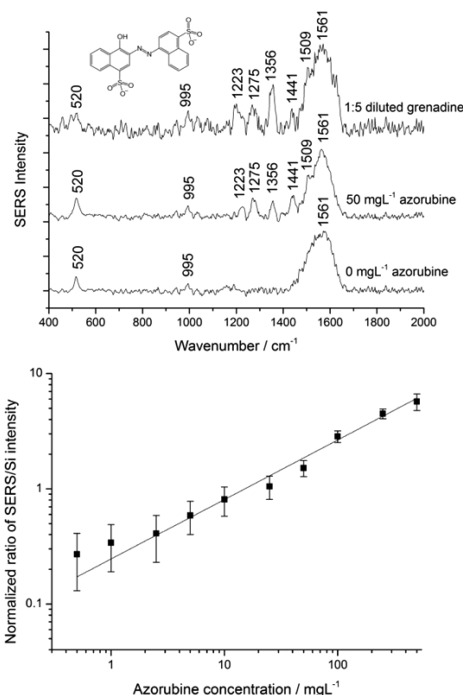


Figure 3. (Top) SERS spectra obtained from pure azorubine and grenadine (control experiment, RS spectrum of clean metal substrate). Spectra are shifted vertically for clarity. (Inset) Chemical structure of azorubine. (Bottom) Calibration curve, normalized SERS intensity at 1356 cm^{-1} of azorubine versus concentration.

for 50 mg L^{-1} , for example) are assigned to the azorubine dye. The other bands are attributed to the solid support: 520 cm^{-1} to silicon and 995 and 1560 cm^{-1} to polystyrene beads²⁷ (Figure 3 top, spectrum for 0 mg L^{-1}). The SERS spectra were normalized using the silicon Raman band at 520 cm^{-1} and the SERS intensity was determined as the area of the 1356 cm^{-1} azorubine band. The log–log plot of the calibration curve (Figure 3 bottom) exhibits a linear trend indicating the possibility of performing quantitative SERS analysis. In the case of low azorubine content, the signal-to-noise ratio of the SERS spectra is low and the azorubine concentrations were estimated with high uncertainty (about 30%). However, the determination of the azorubine content in the relevant concentration range, determined by the limit of usage set by the EU (50 and 200 mg L^{-1}), is possible with sufficient accuracy.^{6,7} Further on, traces of azorubine more than 1 order of magnitude lower than these threshold values are still detectable. Hence, the used method provides a good estimation of the azorubine content in the relevant concentration range and can be applied as simple and rapid (35 min) prescan method.

To prove the potential of our approach for azorubine detection in complex matrices, we tested seven commercially

available sweet drinks: five with expected positive azorubine contents (energy drink, grenadine, raspberry lemonade, strawberry vodka, and passion fruit vodka) and two red-colored negative controls without azorubine (blood orange lemonade and raspberry syrup). The above-mentioned drinks are characterized by unified composition, regardless of their complexity (sugar/artificial sweetener, ethanol content, etc.). The drinks were diluted 1:5 with water to improve the signal-to-noise ratio and to lower the high background signals caused by sugar, as well as to operate in the concentration range where the substrate is the most sensitive to differences in the azorubine concentration. SERS spectra of all five positive samples clearly show the azorubine Raman bands without any spectral interference from other additives in drink (Figure 4).

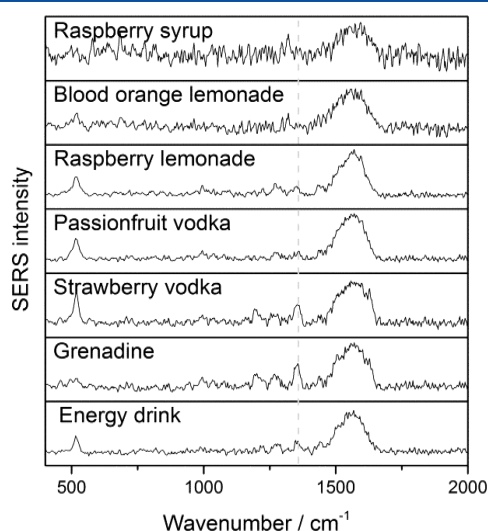


Figure 4. Typical SERS spectra of all commercial samples. Gray dashed line indicates the azorubine peak at 1356 cm^{-1} used for determination of azorubine concentration. Full size spectra are available in the Supporting Information.

This indicates that azorubine dye itself has a sufficiently high affinity to the Au surface. The azorubine concentration in each drink was determined by interpolation of the area of normalized 1356 cm^{-1} azorubine band in corresponding SERS spectrum using the calibration curve. The results summarized in Table 1 show close correlation of azorubine concentrations obtained by SERS and standard HPLC technique in all tested drinks. The grenadine, which appeared

Table 1. Azorubine Concentration in Different Drinks Identified by HPLC and SERS

sample	HPLC (mg L^{-1})	SERS (mg L^{-1})
energy drink	26 ± 2.6	27 ± 5
grenadine	280 ± 28.0	355 ± 77
strawberry vodka	12 ± 1.2	18 ± 4
passion fruit vodka	1.7 ± 0.2	4.7 ± 1.8
raspberry lemonade	4 ± 0.4	5.3 ± 1.4
blood orange lemonade	<0.1	<0.2
raspberry syrup	<0.1	<0.2

as thick, dense syrup, was found exceeding the level of azorubine content permitted in the European Union;⁶ however, the serving instructions on the bottle label specifically suggested dilution to 1:10 before drinking.

The higher-than-expected signal from alcoholic samples was attributed to the lower surface tension of the liquids, which led to their penetration into nanoscopic gaps in the FON structure, thus increasing the amount of deposited azorubine. The two negative controls were correctly identified due to the absence of 1356 cm^{-1} azorubine peak in the SERS spectra.

4. CONCLUSIONS

In conclusion, the Au FON substrates prepared on silicon wafer represent robust, highly sensitive and reproducible SERS substrates that can be applied for quantitative analysis of azorubine dye in different sweet drinks with minimum effort. The analysis is rapid (35 min) and direct, without the need for any pretreatment of the samples or functionalization of the Au surface. This makes SERS a perfect prescan method, which can be easily implemented for field application employing portable Raman systems in future work and for fast preliminary testing of foods and beverages.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Estimation of the limit of detection applying SERS; powder azorubine spectrum together with band assignment; and full-size spectra of commercial samples. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: dana.cialla-may@uni-jena.de.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Funding of research projects P205/13/20110S from the Czech Science Foundation and grant No. SVV 260092 from the Charles University in Prague, QuantiSERS (03IPT513A) and JBCI 2.0 (03IPT513Y) within the framework of InnoProfile Transfer—Unternehmen Region of the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF) is gratefully acknowledged. The authors thank Bernd Giese (Food GmbH) for critical discussions.

■ REFERENCES

- (1) Sahu, J. K. *Introduction to Advanced Food Process Engineering*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2014.
- (2) McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler, D.; Dalen, L.; Grimshaw, K.; Kitchin, E.; Lok, K.; Porteous, L.; Prince, E.; Sonuga-Barke, E.; Warner, J. O.; Stevenson, J. *Lancet* **2007**, *370*, 1560–1567.
- (3) Osman, M. Y.; Sharaf, I. A.; Osman, H. M. Y.; El-Khouly, Z. A.; Ahmed, E. I. *Br. J. Biomed. Sci.* **2004**, *61*, 128–132.
- (4) Rowe, K. S. *Aust. Paedr. J.* **1988**, *24*, 143–147.
- (5) Groten, J. P.; Butler, W.; Feron, V. J.; Kozianowski, G.; Renwick, A. C.; Walker, R. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2000**, *31*, 77–91.
- (6) The European Commission, Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation

- (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Off. J. Eur. Union*, L295, 1, 12/11/2011.
- (7) The European Commission, Commission Regulation (EU) No 232/2012 of 16 March 2012 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council as regards the conditions of use and the use levels for Quinoline Yellow (E 104), Sunset Yellow FCF/Orange Yellow S (E 110) and Ponceau 4R, Cochineal Red A (E 124). *Off. J. Eur. Union*, L78, 1, 17/3/2012.
- (8) Miniotti, K. S.; Sakellariou, C. F.; Thomaidis, N. S. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 103–110.
- (9) Chen, Q. C.; Mou, S. F.; Hou, X. P.; Riviello, J. M.; Ni, Z. M. *J. Chromatogr. A* **1998**, 827, 73–81.
- (10) Wang, Y. Z.; Wei, D. P.; Yang, H.; Yang, Y.; Xing, W. W.; Li, Y.; Deng, A. P. *Talanta* **2009**, 77, 1783–1789.
- (11) Zheng, J. K.; He, L. L. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, 13, 317–328.
- (12) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*; Elsevier: Amsterdam, 2009.
- (13) Bantz, K. C.; Meyer, A. F.; Wittenberg, N. J.; Im, H.; Kurtulus, O.; Lee, S. H.; Lindquist, N. C.; Oh, S. H.; Haynes, C. L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 11551–11567.
- (14) Cialla, D.; Marz, A.; Bohme, R.; Theil, F.; Weber, K.; Schmitt, M.; Popp, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 27–54.
- (15) Procházka, M.; Štěpánek, J. In *Applications of Raman Spectroscopy to Biology: From Basic Studies to Disease Diagnosis*, Ghomi, M., Ed.; IOS Press: Amsterdam, 2012.
- (16) Schlücker, S. In *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2010; pp 263–283.
- (17) Schlücker, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 4756–4795.
- (18) Negri, P.; Dluhy, R. A. *J. Biophotonics* **2013**, 6, 20–35.
- (19) Bell, S. E. J.; Sirimuthu, N. M. S. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1012–1024.
- (20) Banholzer, M. J.; Millstone, J. E.; Qin, L. D.; Mirkin, C. A. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 885–897.
- (21) Fan, M. K.; Andrade, G. F. S.; Brolo, A. G. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 693, 7–25.
- (22) Zhang, J. H.; Li, Y. F.; Zhang, X. M.; Yang, B. *Adv. Mater.* **2010**, 22, 4249–4269.
- (23) Baia, L.; Baia, M.; Popp, J.; Astilean, S. J. *Phys. Chem. B* **2006**, 110, 23982–23986.
- (24) Haynes, C. L.; Yonzon, C. R.; Zhang, X. Y.; Van Duyne, R. P. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 471–484.
- (25) Kosiorek, A.; Kandulski, W.; Chudzinski, P.; Kempa, K.; Giersig, M. *Nano Lett.* **2004**, 4, 1359–1363.
- (26) Palacký, J.; Mojžeš, P.; Bok, J. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, 42, 1528–1539.
- (27) Anema, J. R.; Brolo, A. G.; Felten, A.; Bittencourt, C. J. *J. Raman Spectrosc.* **2010**, 41, 745–751.
- (28) Snehaltha, M.; Ravikumar, C.; Joe, I. H.; Sekar, N.; Jayakumar, V. S. *Spectrochim. Acta, Part A* **2009**, 72, 654–662.

Quantitative SERS Analysis of Azorubine (E 122) in Sweet Drinks

Vlastimil Peksa, Martin Jahn, Lucie Štolcová, Volker Schulz, Jan Proška, Marek Procházka, Karina Weber, Dana Cialla-May and Jürgen Popp

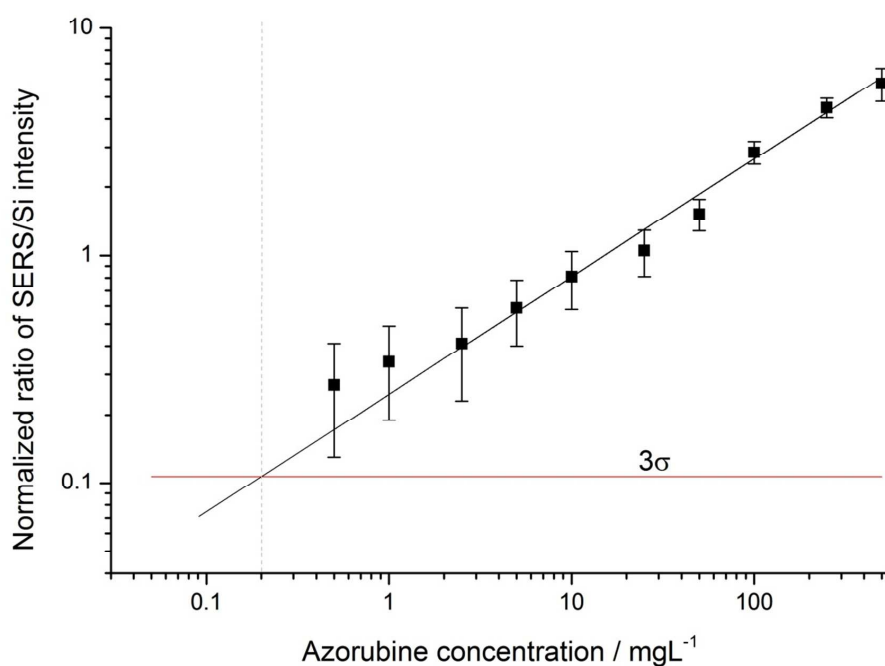
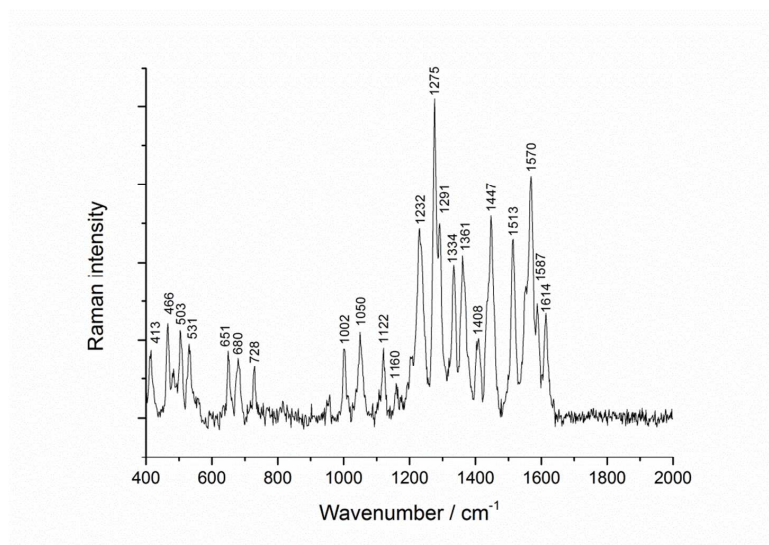


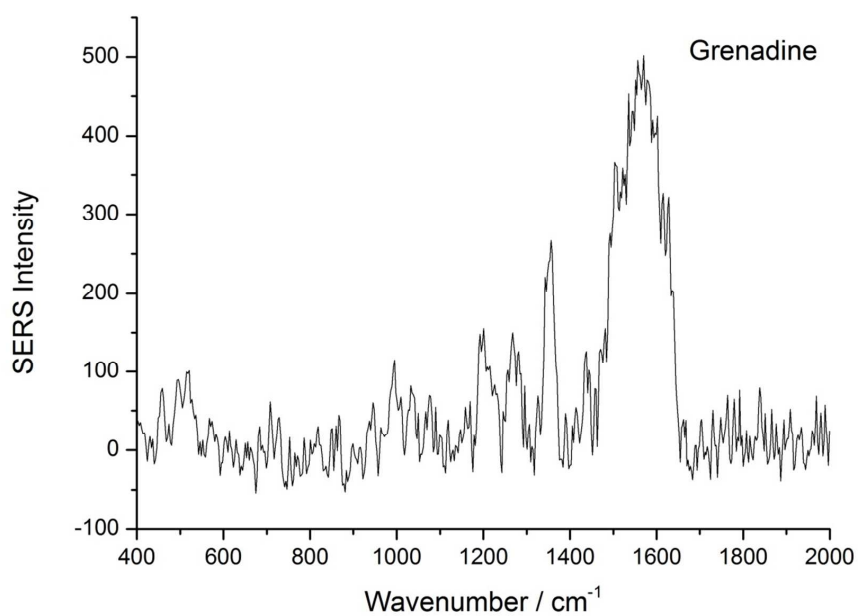
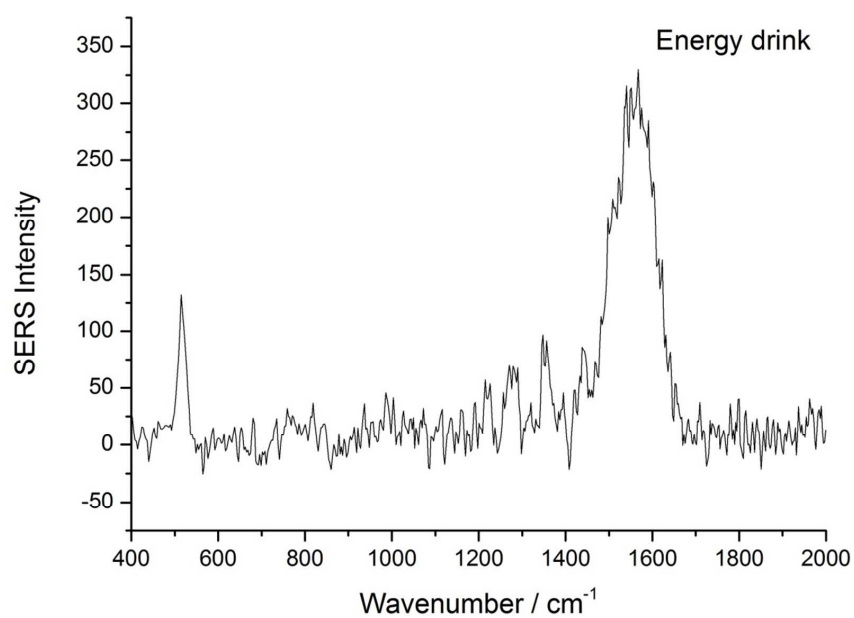
Figure S1: Calibration curve: normalized SERS intensity at 1356 cm⁻¹ of azorubine as function of the concentration. The red line is indicating 3 σ of the background, which reflects the limit of detection based on the definition by IUPAC.

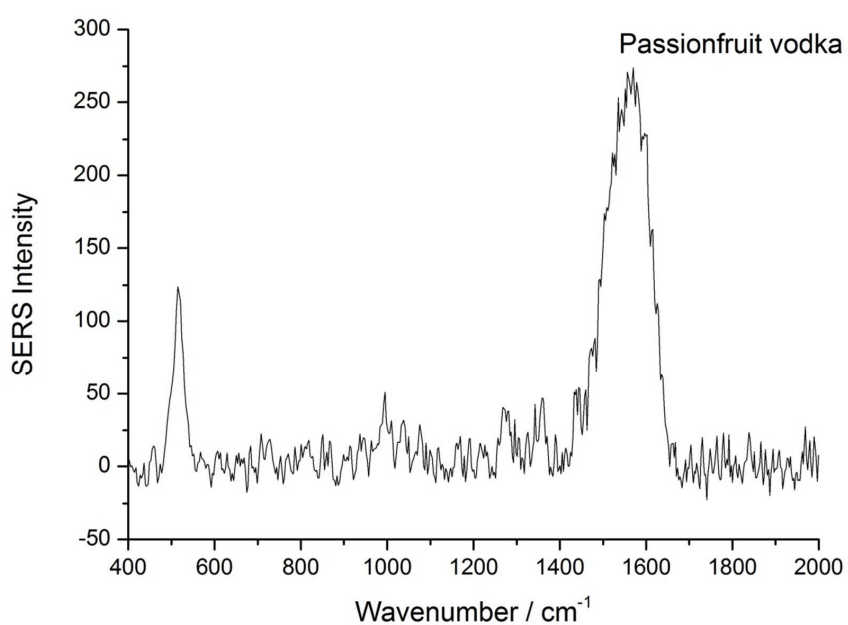
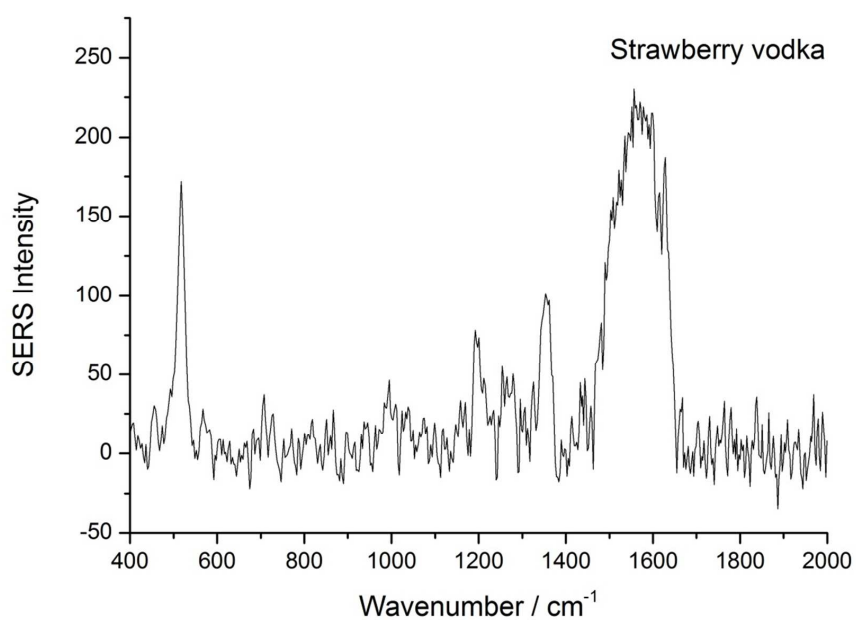


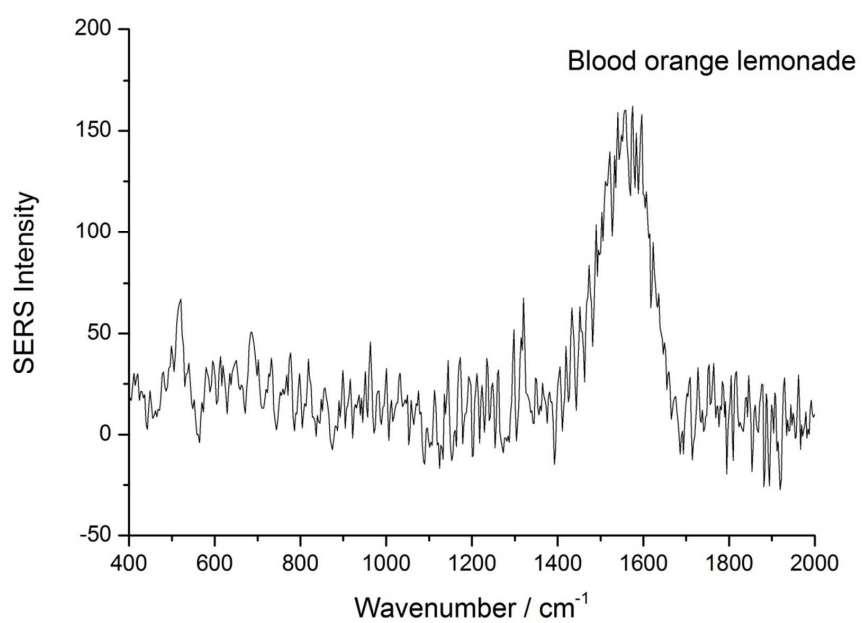
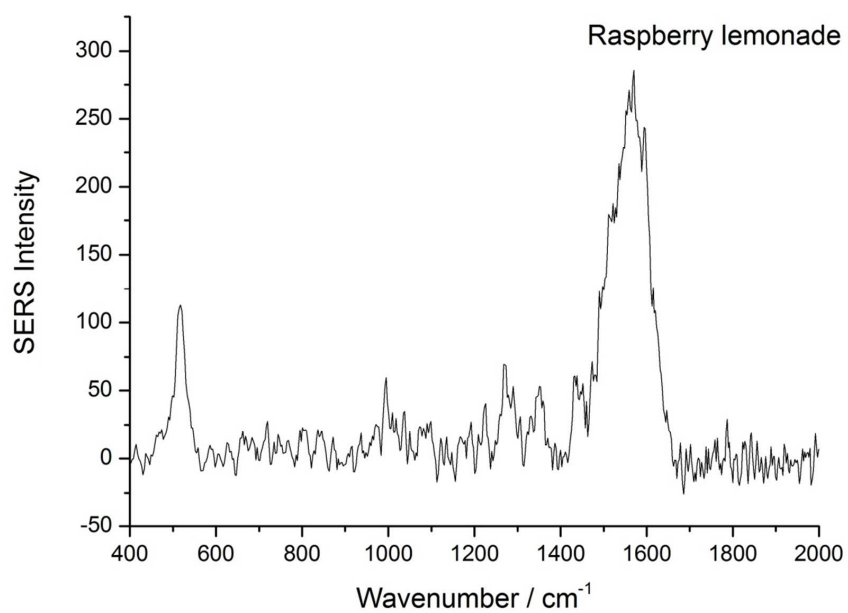
$\nu_{\text{Powder}} (\text{cm}^{-1})$	$\nu_{\text{SERS Au}} (\text{cm}^{-1})$	Assigned vibration mode
1614	-	Naph (2) ring stretch + O18-H19 i.p. bend
1570	1570	Naph (2) ring stretch + O18-H19 i.p. bend
1513	1507	Naph (2) ring stretch
1447	1441	CH Naph (2) i.p. bend + C9-N17-N24 i.p. bend
1408	1402	CH Naph (1) i.p. bend + Naph (2) stretch
1361	1355	N17 N24 stretch + Naph (2) stretch
1334	1336	C-H Naph (1,2) i.p. bend + (C-N N-C) asym. stretch
1275	1275	C9-N17 stretch + CH Naph (2) i.p. bend
1232	1226	C10-O18 stretch + (C-N N-C) asym. Stretch
1160	1156	C-H Naph (1) i.p. bend + C25-N24 stretch
1122	1113	C-N i.p.b. + CH Naph (1) i.p. bend
1050	1040	SO3 sym. stretch + Naph rings (1,2) def
1002	998	(C-N N-C) i.p. bend + Naph rings (1,2) def
728	-	SO3 sym. bend + Naph rings o.p. bend
680	673	SO3 sym. bend + Naph rings def
651	-	O18-H19 o.p.b
531	531	Naph rings def. + SO3 wagging
503	483	SO3 wagging + C-N torsion
466	460	SO3 wagging + OH bend + Naph rings torsion
413	-	SO3 rocking + Naph rings torsion N17 N24 torsion

Figure S2: Spectrum from powder azorubine was measured with a 785 nm laser excitation wavelength with 100 μW power output. Vibrational modes were assigned according to Snehathatha et al.^[1]

[1] M. Snehathatha, C. Ravikumar, I. H. Joe, N. Sekar, V. S. Jayakumar, *Spectrochim. Acta, Part A* **2009**, 72, 654-662.







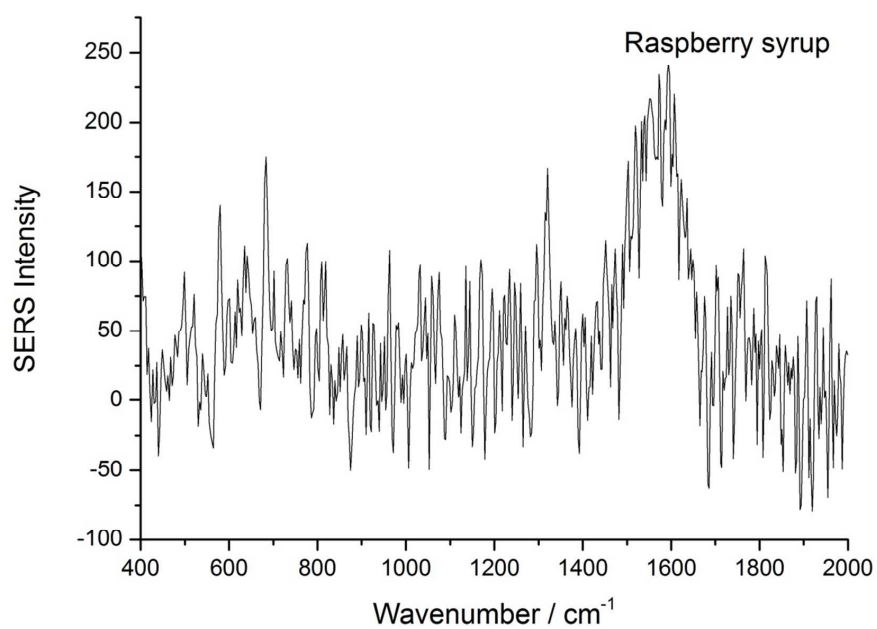


Figure S3: Full sized spectra of each commercial sample from Figure 4.

**1.2. Towards SERS based applications in food analytics:
Lipophilic sensor layers for the detection of Sudan III in
food matrices [MJ]**

Martin Jahn, Sophie Patze, Thomas Bocklitz, Karina Weber, Dana Cialla-May,
Jürgen Popp

Analytica Chimica Acta, 2015, 860, 43 – 50

Reprinted with kind permission from Elsevier, Copyright © 2015.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267015000082>



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Towards SERS based applications in food analytics: Lipophilic sensor layers for the detection of Sudan III in food matrices



Martin Jahn^{a,b}, Sophie Patze^{a,b}, Thomas Bocklitz^a, Karina Weber^{a,b},
Dana Cialla-May^{a,b,*}, Jürgen Popp^{a,b}

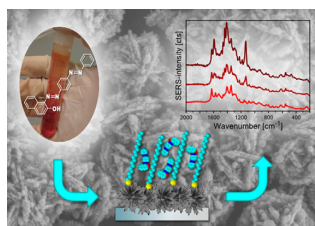
^a Friedrich-Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany

^b Leibniz Institute of Photonic Technology (IPHT) Jena, Albert-Einstein-Strasse 9, 07745 Jena, Germany

HIGHLIGHTS

- A lipophilic sensor layer was applied to enzymatically grown SERS substrates.
- Sudan III molecules could be detected in presence of water-insoluble competitors.
- The carcinogenic food dye Sudan III was detected in a relevant concentration range.
- Multivariate statistics allows quantitative measurements of Sudan III.
- Sudan III contaminations were successfully detected out of spiked paprika powder.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 September 2014

Received in revised form 10 December 2014

Accepted 4 January 2015

Available online 6 January 2015

Keywords:

Surface enhanced Raman spectroscopy

Sensor layers

Food safety

Sudan dye detection

ABSTRACT

Food safety is a topic of great importance for our society which places high demands on analytical methods. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) meets the requirements for a rapid, sensitive and specific detection technique. The fact that metallic colloids, one of the most often used SERS substrates, are usually prepared in aqueous solution makes the detection of water-insoluble substances challenging. In this paper we present a SERS based approach for the detection of water-insoluble molecules by applying a hydrophobic surface modification onto the surface of enzymatic generated silver nanoparticles. By this approach the detection of the illegal water-insoluble food dyes, such as Sudan III in presence of riboflavin, as water-soluble competitor, is possible. Moreover, we demonstrate the usability of this kind of SERS substrates for determination of Sudan III out of spiked paprika extracts.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

For design purposes and for feigning a certain grade of quality a multitude of dyes are used in industrial food production. Some of these substances are harmful to human health which results, depending on their danger potential, in the definition of statutory limit values or the prohibition as food additive. Sudan dyes, which belong to the group of azo dyes, and especially their metabolites,

* Corresponding author at: Friedrich-Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany.
Tel.: +49 3641 206309.

E-mail address: dana.cialla-may@uni-jena.de (D. Cialla-May).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.005>

0003-2670/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature

EBL	Electron beam lithography
EFSA	European Food Safety Authority
EGNP	Enzymatically generated silver nanoparticles
GOPS	3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane
HRP	Horseradish peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
LSL	Lipophilic sensor layer
PCA	Principal component analysis
PLSR	Partial least squares regression
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
SEM	Scanning electron microscope
SERS	Surface enhanced Raman spectroscopy

aromatic amines, are mutagenic [1] wherefore these substances are listed as category 3 carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [2]. In 2003 the French rapid alert system for food and feed (RASFF) notified the first cases in which Sudan dyes were found in groceries. As a consequence, the European Food Safety Authority (EFSA) decided to direct emergency measurements for this unauthorized food additive [3]. In the following years, Sudan dye contaminations were primarily found in food products like palm oil, paprika or chili mixtures [4]. Therefore, fast and reliable detection schemes are of high importance to ensure food safety.

The nowadays standard procedure relies on highly sensitive chromatographic approaches which require several sample pre-processing steps [5]. Sampling is usually achieved by liquid phase extraction based on organic solvents like acetone, acetonitrile or methanol. This step is in many cases followed by an additional cleaning and purification process utilizing solid phase extraction cartridges. For the analysis liquid chromatography, mainly high-pressure liquid chromatography (HPLC), in combination with different types of mass spectrometry is applied [6–9]. Moreover, other types of detectors like UV–vis-spectrometers [10–12] or photodiode arrays [13–17] come also into operation. An elaborate overview about sample pre-processing and various types of chromatographic approaches for detecting Sudan dyes can be found herein [5].

To reduce the equipment required and shorten the analysis time, methods with less need for cost-intensive instruments and less time-consuming sample processing protocols are under development. In recent years, it was demonstrated that immunosorbent assays [18–21] as well as electrochemical sensors based on voltammetric readout [22–24] can be applied for this analytical problem. Additionally, the applicability of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in combination with chemometric methods was presented [25,26]. Further concepts rely on the quenching of the fluorescence of Mn–ZnS quantum dots [27] or polyethyleneimine-capped silver nanoclusters [28] by Sudan dye molecules in close vicinity. Fluorescence quenching is also the underlying principle of an approach based on a ligand exchange reaction between a Cu(II)-calcein complex and the Sudan molecule [29]. Moreover, light scattering at silver nanoparticles prepared by a redox reaction between AgNO₃ and the dye molecules itself was applied as indirect method for the determination of Sudan contaminations [30]. However, the majority of the techniques presented above offer exclusively an indirect proof depending on specific reactions. Solely mass spectrometry and NMR provide fingerprint like spectra of the sample constituents which is beneficial for analytic tasks.

Due to its high specificity Raman spectroscopy is a suitable and widely used method for a high number of analytical tasks [31–36]. However, the Raman-effect is a very weak scattering process. Thus, the detection of substances in low concentrations by means of Raman spectroscopy is not practicable. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS), which combines the benefits of Raman scattering with the electromagnetic and chemical enhancement induced by metallic nanoparticles, is capable to overcome this limitation. By applying SERS the detection down to very low concentrations and even of single molecules can be achieved [37–43]. An additional advantage is the fluorescence quenching of molecules in proximity of the nanoparticles. Concerning the detection of azo dyes mainly metallic colloids [44–46] and substrates produced via bottom-up techniques are applied up to now. Beside these, electro-polished aluminum foils [47,48], aluminum electrodes [49], arrays of metallic nanowires [50,51], silver nanoparticle decorated silicon nanowires [52] and ZnO/Ag nanostructures produced via photo catalysis [53] were also applied as SERS substrates for the Sudan dye detection.

Clustered metallic colloids in solution provide extremely high signal enhancements, but one of the main problems of all types of SERS substrates, the missing reproducibility, is in this case especially pronounced. By combining SERS with microfluidics this problem can be remarkably reduced due to the possibility of high data acquisition rates which lead to an enhanced statistical stability of the dataset [54–56]. However, significant limitations exist due to the fact that the colloids are mainly prepared in aqueous solution. This makes the detection of water-insoluble substances less advantageous. Therefore, planar substrates seem to be more favourable for the task of Sudan detection. By electron beam lithography (EBL) high reproducible structures with an adequate signal enhancement can be fabricated [57–61]. However, the technical effort of the EBL process is too high for the production of substrates for a fast on-site detection method. Hence, nano-imprint lithography could be used to reduce the costs [62–64]. Another possibility is to use low-cost substrates prepared by self-organizing processes.

Within this contribution, we present the application of enzymatically generated silver nanoparticles (EGNP) [65–67], prepared by a bottom-up and self-organizing procedure, in combination with a lipophilic sensor layer (LSL) for the detection of Sudan dyes in presence of water-soluble competitors in the sample solution. The aforementioned surface modification consists of aliphatic hydrocarbons with a thiol moiety. Due to the high affinity of the thiol groups to noble metal surfaces [68–70] a self-assembled hydrophobic monolayer is formed on the SERS substrate. The resulting layer is used to repel water-soluble substances from the surface whereas water-insoluble molecules remain there and can, therefore, be detected by means of SERS. To the best of our knowledge, this is the first approach to use such type of layers for reducing the contribution of unwanted water-soluble constituents to the SERS spectra. This allows the detection of Sudan dyes in their presence. For these experiments, riboflavin is introduced as water-soluble competitor, which is part of the relevant food matrices, like paprika products. Furthermore, it is known as suitable reporter molecule for the characterization of SERS substrates due to its high Raman cross section. Beside the results on artificial model systems, also first results on spiked paprika powder extracts are discussed.

2. Material and methods

2.1. Reagents

High purity methanol and heptane were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The chemicals octanethiol,

octadecanethiol, riboflavin, Sudan III as well as 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GOPS) and streptavidin peroxidase polymer were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). The supplier for the biotin labelled oligonucleotides was Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). For preparing the enzymatic generated nanoparticles the silver containing reagent EnzMet™ from Nanoprobes, Inc. (Yaphank, NY, USA) was used. The methanol based paprika extract was delivered by the Food GmbH (Jena, Germany).

2.2. Sample preparation

The 0.1 mmol L⁻¹ riboflavin and Sudan III stock solutions were prepared by solving the powder in water and heptane, respectively. In order to prepare a 1:1 mixture of both substances methanol was the solvent of choice due to its ability to solve both polar and nonpolar substances. Furthermore, methanol is also commonly used for the extraction of Sudan III from real food samples [5]. The methanol based paprika extract was yielded by means of liquid–liquid-extraction. For the preparation of the spiked paprika sample the paprika extract was mixed with a ratio of 1:10 with a 10 μmol L⁻¹ methanol based Sudan III solution. This results in a Sudan III concentration of 9 μmol L⁻¹, which corresponds to a realistic amount of Sudan III in paprika powder [5].

The SERS active silver nanostructures were fabricated following a previously published protocol for producing enzymatically generated silver nanoparticles (EGNP) [65,67]. The method is based on the deposition of silver ions from a silver containing solution caused by the enzymatic activity of horseradish peroxidase (HRP) which is immobilized onto the substrate material. In all experiments conventional glass slides were used as substrates for the SERS-active EGNP structures. In order to generate a LSL on the surface of the EGNP, the substrates were immersed in a heptane based solution of aliphatic hydrocarbons with a thiol moiety for 30 min. The solution was prepared by mixing one part of an octanethiol solution (1 mmol L⁻¹ in heptane) and two parts of an octadecanethiol solution (1 mmol L⁻¹ in heptane). Thus, a layer of octane- and octadecanethiol molecules is arranged directly onto the surface of the silver nanoparticles while using the concept of self-assembled monolayers [71].

2.3. Instrumentation and data processing

Secondary electron images were recorded by means of a scanning electron microscope (SEM) JSM-6700 F from JEOL (Tokyo, Japan) to characterize the EGNP without and with LSL. The acceleration voltage of the electron beam was set to 15 kV. In addition, contact angle measurements were performed using the video based optical contact angle measuring instrument OCA 20 from DataPhysics Instruments (Filderstadt, Germany). Droplets of distilled water with a volume of 1 μL were put onto the substrates, photographed and analyzed by the corresponding software.

The IR reflection spectra, to prove the existence of the LSL, were collected applying a FTIR spectrometer Vertex 80 v connected to a microscope Hyperion 2000 equipped with a MCT type detector D316 from Bruker (Billerica, USA). The presented spectra resulting from averaging over 128 single spectra measured on an area of 200 × 200 μm² by an 15 times IR objective with a numerical aperture of 0.4.

For recording the SERS spectra the confocal Raman microscope alpha300 SR from WITec (Ulm Germany) with an Argon ion laser as light source was applied. All presented spectra were gathered using the laser line at 488 nm. A 100× objective with a numerical aperture of 0.8 was used for focusing the incident light onto the sample and collecting the back-scattered light. The resulting laser

spot size was about 1 μm in diameter whereby the laser power measured at the sample position was set to 20 μW during the measurements. The collected light was detected using a spectrometer with a 600 lines mm⁻¹ grating and a 1024 × 127 pixels CCD camera at a working temperature of 208 K. The resolution of all measured spectra is 6 cm⁻¹. Each single spectrum was recorded setting the integration time to 0.3 s while moving the sample during the measurement to prevent burning of the analyte molecules. By this, image-scans consisting of 100 single spectra were collected from a designated area of 60 × 60 μm² (50 lines with two measurements per line). All presented mean spectra were calculated out of a certain number of such image-scans, performed at different positions on the substrate. The spectra in Fig. 5a were additionally normalized based on the peak at 935 cm⁻¹, which corresponds to the background signal of the EGNP. The normalization was carried out before the calculation of the mean spectrum for every single spectrum. Therefore, the following approach came into operation. Around the center of the peak at 935 cm⁻¹ a range of 20 cm⁻¹ was spanned and the intensity of all data points in this region was summed up. Afterwards every data point in the spectrum was divided by this sum.

For showing the feasibility of quantitative measurements a multivariate statistical model came into operation. All computation steps were performed using the statistical programming language R [72]. First, the raw spectra were interpolated to the same wavenumber grid by spline functions, background subtracted and cut to the spectral region of interest. The interpolation is done in order to suppress possible changes caused by the grating movement. For the estimation of the background the selective nonlinear iterative peak clipping (SNIP) algorithm was applied [73]. Then, the mean spectra derived from every image-scan (100 spectra) were calculated. The number of image scans is ten for each concentration step and 26 for the background of the EGNP. After the pre-processing of the raw data a principal component analysis (PCA) was carried out as dimension reduction step. Subsequently, a partial least squares regression (PLSR) [74] was applied. In order to build up the PLSR model the first four PCA scores were utilized and four PLS latent variables were constructed.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the LSL on EGNP

One of the main challenges for detecting Sudan dyes in food samples is the background signal caused by the food matrix. Paprika powder, for example, contains several water-soluble vitamins, like niacin, riboflavin and thiamine. Therefore, we apply a so called LSL consisting of aliphatic hydrocarbons immobilized on the metallic, SERS-active surface in order to repel the water-soluble components of the sample solution. In Fig. 1a, the operating principle of the LSL is introduced. Due to the strong affinity of thiol moieties to the metal surface, a self-assembled monolayer consisting of octane- and octadecanethiol is formed. As a result of the hydrophobicity of the LSL, unwanted water-soluble substances contained in the sample solution get repelled from the surface and can be washed off by the solvent in a further step. In contrast, water-insoluble substances get attached to the layer, remain there after washing and can be detected via SERS.

In order to synthesize the LSL the SERS-active surface is exposed to heptane which is used as solvent for the aliphatic hydrocarbons. In order to check for possible shape changes of the nanoparticles due to the incubation SEM micrographs were acquired. In Fig. 2a, the SEM images of pure EGNP (top) and EGNP with LSL (bottom) are presented. The comparison of the nanoparticles does not reveal significant difference in their shape. Furthermore, the contact

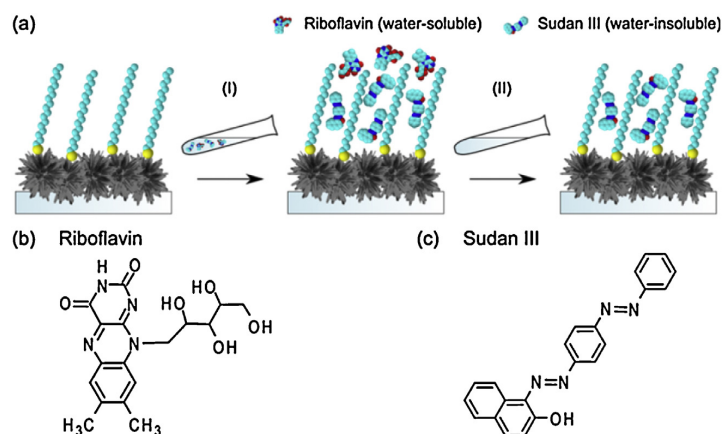


Fig. 1. Operating principle of LSLs (a): incubation with methanol based mixture of Riboflavin and Sudan III (step I) is followed by washing the SERS substrates with pure methanol (step II) to get rid of unbound molecules. Molecular structure of the used analytes: the water soluble vitamin riboflavin (b) and the water-insoluble azo-dye Sudan III (c).

angle of distilled water droplets was measured to prove that the modified surface in the case of EGNP with LSL show the wanted high hydrophobicity. In Fig. 2b, a remarkable difference between the measured contact angles for pure EGNP (top) and for those with LSL (bottom) is visible. For the first case the contact angle amounts to about 15° whereas in the second case it is remarkably increased to 120° . This behaviour serves as evidence for the existence of the hydrophobic layer on the surface of the silver nanoparticles. The presence of alkanethiols bonded to the substrate surface was additionally proved by applying FTIR measurements in reflection geometry. The LSL consists in this particular case exclusively of octadecanethiol molecules, whereby the rest of the preparation protocol for the hydrophobic layer was unchanged. To exclude signals originating from residuals of heptane, which is used in the last washing step after preparing

the LSL, also the pure EGNP got rinsed into heptane and dried at air. In Fig. 2c, the spectrum measured at pure EGNP (blue line) is compared with the one recorded at EGNP with LSL (green line). The two bands at 2915 cm^{-1} and 2855 cm^{-1} , which can be assigned to CH_2 -stretching modes [75,76], solely appear in the spectrum of the surface modified EGNP. Hence, we can assume that indeed octadecanethiol molecules are bonded to the silver surface.

3.2. Detection of Sudan III in presence of riboflavin applying EGNP with LSL

In order to demonstrate the functionality of the LSL a methanol based mixture of Sudan III and riboflavin (vitamin B_2) was applied. Riboflavin (molecular structure displayed in Fig. 1b), which is a natural constituent of paprika or chili [77], was chosen as one

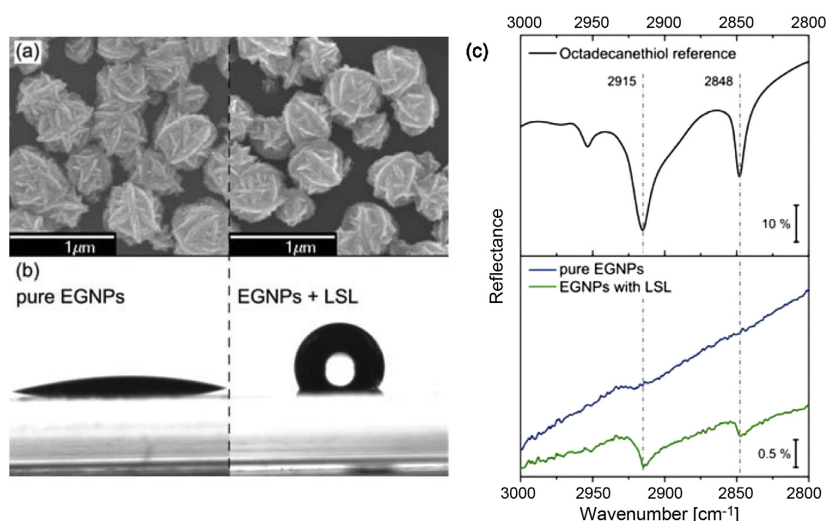


Fig. 2. Comparison of the SEM images (a) and images of distilled water droplets (b) on the surface of pure EGNP (left) and EGNP with LSL (right) for contact angle measurements. IR reflection spectra (c) of crystallized octadecanethiol (black), pure EGNP (blue) and EGNP with LSL (green) measured on gold films. The two bands at 2915 cm^{-1} and 2848 cm^{-1} can be assigned to CH_2 -stretching modes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

potential water-soluble constituent of the food matrix. Additionally, in comparison with Sudan III (molecular structure displayed in Fig. 1c) it shows the higher signal intensity in the recorded SERS spectra (Fig. 4), therefore, representing a potentially strong interference in real samples. Hence, the detection of Sudan molecules in presence of riboflavin is challenging, wherefore, it is a reasonable choice as water-soluble competitor. The reference Raman spectra of both substances are depicted in Fig. 3a and b. For comparison, measurements were performed on EGNP with, as well as, without LSL. In Fig. 3c the background signal of both kinds of substrates is presented. To cover the SERS active surface with analyte molecules the EGNP were incubated for 30 min into the sample solutions and afterwards washed with the particular solvent. After the washing step the substrates were dried with pressured air.

The SERS measurements of the analyte substances were carried out by using the scan mode of the microscope to avoid the destruction of the analyte molecules by the intense laser light focused onto the sample. Every average spectrum consists of 10 scans, whereby, each scan contains 100 measurement points. In Fig. 4, the spectra of a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ aqueous riboflavin solution (blue) and a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ heptane based Sudan III solution (black) measured on EGNP without LSL are depicted as reference. It is obvious from Fig. 4 that the signal intensity in the case of riboflavin is one order of magnitude higher when compared with the one for Sudan III. Furthermore, the spectra of the methanol based mixture solution of riboflavin and Sudan III measured at EGNP without (orange) and with (red) LSL are presented in Fig. 4. The average

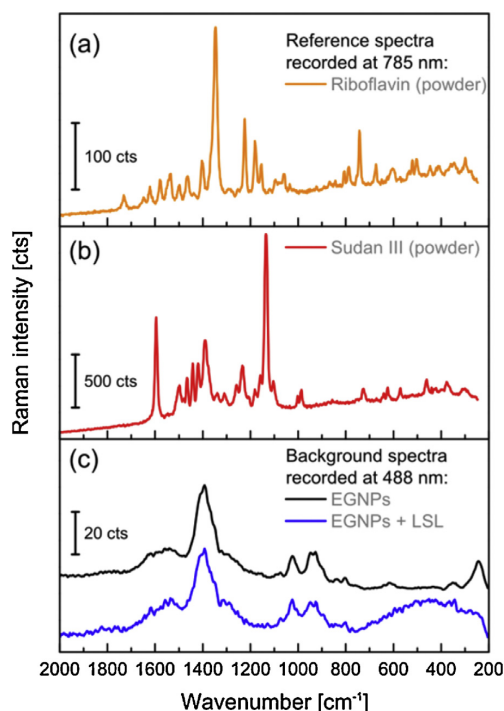


Fig. 3. Reference Raman spectra of (a) riboflavin and (b) Sudan III in powder form recorded utilizing a 785 nm laser. The black and blue curve in (c) represents the background spectrum of pure EGNP and EGNP with LSL, respectively. Both spectra result from averaging over 10 image scans and were recorded at 488 nm on substrates from the same batch as applied for the (later shown) analyte mixture experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

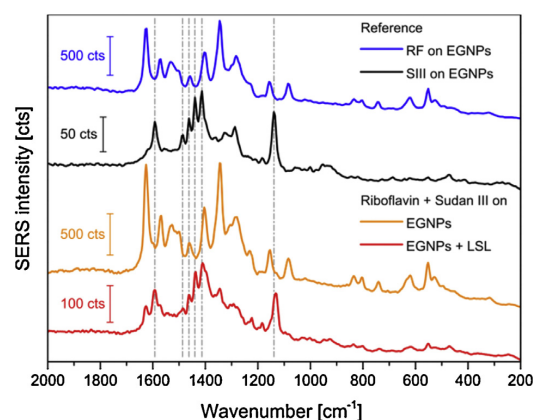


Fig. 4. Reference SERS spectra of riboflavin (blue) and Sudan III (black) measured on pure EGNP. The red and orange colored spectra results from measurements of the riboflavin-Sudan III-mixture on EGNP without and with LSL, respectively. All shown spectra result from averaging over 10 image-scans. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

spectrum resulting from the measurements employing uncoated EGNP is virtually identical to the spectrum of pure riboflavin. Exclusively modes which are typical for riboflavin are visible, wherefore, this kind of substrate is not suitable for the detection of Sudan III in presence of riboflavin as in the sample solution. In contrast, the spectra originating from EGNP with LSL show additional bands to those of riboflavin. By comparison with the spectrum of pure Sudan III, these spectral features can be assigned to the analyte of interest. Hence, by applying the LSL on the EGNP it is more likely to observe water-insoluble molecules out of a solution containing hydrophilic and hydrophobic substances as it would be in the case of pure EGNP.

3.3. Quantitative measurements by applying multivariate statistics

To demonstrate the feasibility of quantitative measurements, experiments with a varying Sudan III concentration in the presence of a constant riboflavin background were carried out. Fig. 5a shows the normalized SERS spectra of analyte mixtures with different Sudan III concentrations. The normalization was carried out for the sake of a better visibility of the spectral details by the approach described in Section 2.3. All spectra were collected on EGNP with LSL out of the same batch. For quantification the Sudan III marker band at 1135 cm^{-1} was used. This mode was chosen due to the lower degree of convolution with Raman modes characteristic to the riboflavin molecule (see e.g., the 1597 cm^{-1} band). Additionally, with increasing the concentration of the target molecule the riboflavin marker band at 1155 cm^{-1} vanishes in intensity. The spectral region of this double peak (from 1110 cm^{-1} to 1170 cm^{-1}) was used to train the statistical model described in Section 2.3. In Fig. 5b, the predicted Sudan III concentration as function of the real concentration is depicted. The error bars represent the standard deviation of the prediction for the obtained image scans. From this, a Sudan III detection limit of about $2.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ (1 mg kg^{-1}) can be deduced, based on the root mean square error of prediction (RMSEP) of the PLSR model. Analysis methods based on chromatographic approaches reach, depending on the applied detector, limits of detection in the range from 5 mg kg^{-1} down to $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ [5]. However, these techniques are often elaborate and require expensive equipment. In addition, the problem of

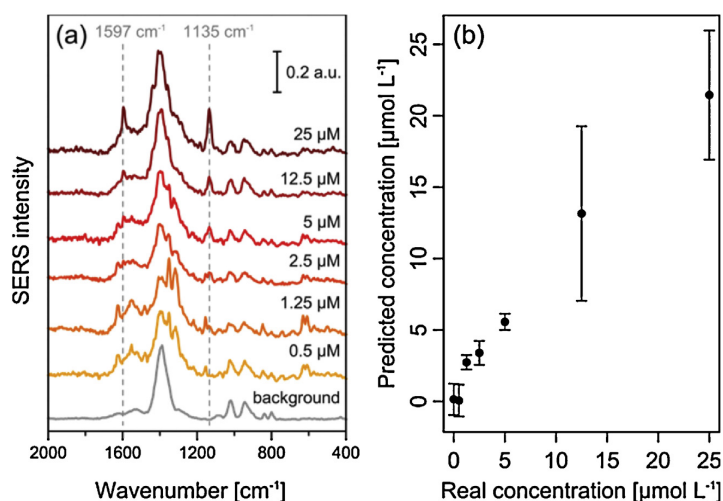


Fig. 5. (a) SERS spectra of riboflavin-Sudan III-analyte mixtures with varying Sudan III content recorded on EGNP with LSL. The two prominent Sudan III marker bands at 1135 cm^{-1} and 1597 cm^{-1} are highlighted by the dashed grey lines. All shown spectra resulted from averaging over 10 image-scans and were normalized to the background signal band at 935 cm^{-1} . (b) Plot of predicted Sudan III concentration obtained by a PLSR model against the experimental values.

co-elution has to be faced. Furthermore, the lowest amounts reported for Sudan dye contaminations in groceries were several milligrams per kilogram food sample [5]. Depending on the extraction protocol the concentration of the resulting stock solution is in the same range. This proves that the surface modified substrate has great potential for detecting Sudan dyes in the micromolar range and, additionally, quantitative analysis by means of PLSR models is also possible to carry out.

3.4. Detection of Sudan III out of spiked paprika extracts

In the next step, the functionality of this approach is demonstrated using Sudan III spiked food samples extracted from paprika powder. In comparison to the previously shown experiments this task is more challenging due to the higher complexity of the real food matrix which contains in addition further competing water-insoluble substances. The Sudan III concentration of the spiked paprika extract was $9\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. In Fig. 6, the spectra of the pure paprika extract as well as the Sudan III spiked extract are depicted. The two spectra at the top are measured employing uncoated EGNP and the two bottom ones result from the use of EGNP with LSL. In general, the spectra from EGNP with LSL show the lower signal intensity due to the increased distance between analyte molecules and the surface. For the pure paprika extract only slight changes in the spectra are caused by the LSL. Solely the intensity of the peak around 1200 cm^{-1} is clearly decreased when using the hydrophobic surface modification. From this, we conclude that the main features in the paprika extract spectrum arise from water-insoluble constituents which get not repelled by the layer. The most prominent bands at 1525 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} and 1005 cm^{-1} can be assigned to carotenoids [79–81]. In spite of the characteristic strong signal of the carotenoids Raman marker bands of Sudan III can be distinguished at a concentration of $9\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ for the substrates with LSL. Namely, the 1135 cm^{-1} band is present as a shoulder and convoluted with the 1155 cm^{-1} Raman mode of carotenoids, while the 1597 cm^{-1} mode has no interferences from the matrix. In comparison, when un-coated EGNP for the detection of Sudan III in the spiked sample are used, this result in a spectrum with only a faint shoulder nearby 1597 cm^{-1} for which detection is rather impossible.

The Sudan III detection out of the paprika matrix using LSL modified EGNP can be explained by considering the small size of the Sudan III molecule as compared to the carotenoids. More exactly, the illegal dye can enter the layer more easily and, therefore, gets into the close proximity of the metallic surface. Hence, its Raman scattering is enhanced more efficiently as compared to the other molecules of the food matrix situated at larger distances. This shows the benefit of the LSL even for the case of the presence of competing water-insoluble substances which are providing high signal intensities. In order to perform future quantification of Sudan III in paprika samples the Raman mode at higher wavenumbers should be considered. This shows the necessity of creating a database where the effects of different matrices on the SERS spectrum of Sudan III will be accounted for.

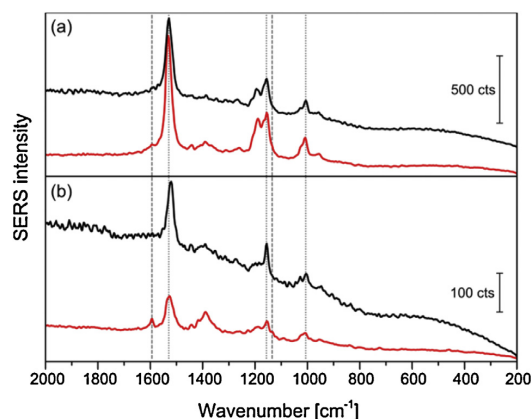


Fig. 6. SERS spectra of pure (black) and Sudan III spiked (red) paprika extract measured on pure EGNP (a) and EGNP with LSL (b). The Sudan III concentration of the spiked paprika extract is $9\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. The dashed and the dotted lines are marking the most prominent carotenoid and Sudan III bands, respectively. All shown spectra result from averaging over 15 image-scans. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Conclusion

A so called lipophilic sensor layer, formed by the self-assembling of aliphatic hydrocarbons, was applied on a planar, SERS active substrate which is based on enzymatically grown silver nanoparticles. By this hydrophobic surface modification it was possible to detect the water-insoluble azo-dye Sudan III in the presence of riboflavin as water-soluble competitor. For this case, a detection limit of $3.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ could be found. When it comes to real food samples, it was proven that these substrates show great potential for detecting Sudan dyes out of methanol based paprika powder extract. In more detail, Sudan III of $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ concentration was detected in presence of the real food matrix. This shows that the limitations of aqueous colloids can be overcome by applying this kind of surface modified EGNP instead. Beside this, LSLs can be also applied for further analytical tasks for which it is beneficial to discriminate water-soluble from insoluble substances.

Acknowledgements

The funding of the research projects 'QuantiSERS' (O3IPT513A) and 'Jenaer Biochip Initiative 2.0' (O3IPT513Y) within the framework 'Unternehmen Region-InnoProfile Transfer' by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF) is gratefully acknowledged. Further, we would like to thank Bernd Giese from Food GmbH (Jena, Germany) for providing the food sample extracts. Moreover, we thank Tina Vasold for her help concerning the contact angle measurements and Franka Jahn for recording the SEM images. A big thank you also goes to Thomas Mayerhöfer for fruitful discussions and his helpful suggestions to this work.

References

- [1] H. Xu, T.M. Heinze, S. Chen, C.E. Cerniglia, H. Chen, Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 7759–7762.
- [2] Overall evaluations of carcinogenicity: an Updating of IARC monographs, vols. 1–42, International Agency for Research on Cancer 1987.
- [3] D. Byrne, Commission decision of 20 June 2003 on emergency measures regarding hot chilli and hot chilli products, *Off. J. Eur. Union* (2003) (2003/460/EC) L 154/114.
- [4] M. Kyprianou, Commission decision of 23 May 2005 on emergency measures regarding chilli, chilli products, curcuma and palm oil, *Off. J. Eur. Union* (2005) (2005/402/EC) (2005) L 135/134.
- [5] R. Rebane, I. Leito, S. Yurchenko, K. Herodes, Review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrices, *J. Chromatogr.* 1217 (2010) 2747–2757.
- [6] L. Di Donna, L. Maiuolo, F. Mazzotti, D. De Luca, G. Sindona, Assay of Sudan I contamination of foodstuff by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and isotope dilution, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5104–5108.
- [7] F. Calbani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistrà, I. Zagnoni, Development and in-house validation of a liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 123–130.
- [8] H. Chen, J. Zheng, X. Zhang, M. Luo, Z. Wang, X. Qiao, Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1045–1056.
- [9] C. Schummer, J. Sassel, P. Bonenberger, G. Moris, Low-level detections of Sudan I, II and IV in spices and chilli-containing foodstuffs using UPLC–ESI–MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 2284–2289.
- [10] C. Long, Z. Mai, X. Yang, B. Zhu, X. Xu, X. Huang, X. Zou, A new liquid–liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chilli products by high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* 126 (2011) 1324–1329.
- [11] C. Piao, L. Chen, Separation of Sudan dyes from chilli powder by magnetic molecularly imprinted polymer, *J. Chromatogr. A* 1268 (2012) 185–190.
- [12] W. Li, X. Zhou, J. Ye, Q. Jia, Development of a γ -alumina–nanoparticle-functionalized porous polymer monolith for the enrichment of Sudan dyes in red wine samples, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3330–3337.
- [13] V. Cornet, Y. Govaert, G. Moens, J. Van Loc, J.-M. Degroot, Development of a fast analytical method for the determination of Sudan dyes in chilli- and curry-containing foodstuffs by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 639–644.
- [14] F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Supramolecular solvent-based microextraction of Sudan dyes in chilli-containing foodstuffs prior to their liquid chromatography–photodiode array determination, *Food Chem.* 121 (2010) 763–769.
- [15] P. Qi, T. Zeng, Z. Wen, X. Liang, X. Zhang, Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC–DAD, *Food Chem.* 125 (2011) 1462–1467.
- [16] L. Enriquez-Gabeiras, A. Gallego, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand, Interference-free determination of illegal dyes in sauces and condiments by matrix solid phase dispersion (MSPD) and liquid chromatography (HPLC–DAD), *Food Chem.* 135 (2012) 193–198.
- [17] Y. Zhu, B. Zhao, R. Xiao, W. Yun, Z. Xiao, D. Tu, S. Chen, Simultaneous determination of 14 oil-soluble synthetic dyes in chilli products by high performance liquid chromatography with a gel permeation chromatography clean-up procedure, *Food Chem.* 145 (2014) 956–962.
- [18] J. Xu, Y. Zhang, J. Yi, M. Meng, Y. Wan, C. Feng, S. Wang, X. Lu, R. Xi, Preparation of anti-Sudan red monoclonal antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Sudan red in chilli jam and chilli oil, *Analyst* 135 (2010) 2566–2572.
- [19] X.C. Chang, X.Z. Hu, Y.Q. Li, Y.J. Shang, Y.Z. Liu, G. Feng, J.P. Wang, Multi-determination of Para red and Sudan dyes in egg by a broad specific antibody based enzyme linked immunosorbent assay, *Food Control* 22 (2011) 1770–1775.
- [20] M. Opatowska, P.J. Stevenson, C. Schulz, L. Hartig, C.T. Elliott, Development of a simple gel permeation clean-up procedure coupled to a rapid disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of Sudan I dye in spices and sauces, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1411–1422.
- [21] J. Wang, K. Wei, H. Li, Q.X. Li, J. Li, T. Xu, A sensitive and selective enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of para red in foods, *Analyst* 137 (2012) 2136–2142.
- [22] A.A. Ensafi, B. Rezaei, M. Amini, E. Heydari-Bafrooei, A novel sensitive DNA–biosensor for detection of a carcinogen Sudan II, using electrochemically treated pencil graphite electrode by voltammetric methods, *Talanta* 88 (2012) 244–251.
- [23] J. Zhang, C.-L. Wang, C. Shentu, W.-C. Wang, Y. He, Z.-D. Chen, Electrochemical detection of Sudan I by using an expanded graphite paste electrode, *J. Electroanal. Chem.* 685 (2012) 47–52.
- [24] M. Elyasi, M.A. Khalilzadeh, H. Karimi-Maleh, High sensitive voltammetric sensor based on Pt/CNTs nanocomposite modified ionic liquid carbon paste electrode for determination of Sudan I in food samples, *Food Chem.* 141 (2013) 4311–4317.
- [25] C.V. Di Anibal, M. Pilar, I. Callao, H.-L. Ruisanchez, NMR variable selection approaches for classification. A case study: the determination of adulterated foodstuffs, *Talanta* 86 (2011) 316–323.
- [26] C.V. Di Anibal, I. Ruisánchez, M.P. Callao, High-resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectrometry combined with chemometric treatment to identify adulteration of culinary spices with Sudan dyes, *Food Chem.* 124 (2011) 1139–1145.
- [27] M. Zhou, X. Chen, Y. Xu, J. Qu, L. Jiao, H. Zhang, H. Chen, X. Chen, Sensitive determination of Sudan dyes in foodstuffs by Mn–ZnS quantum dots, *Dyes Pigm.* 99 (2013) 120–126.
- [28] N.Y. Chen, H.F. Li, Z.F. Gao, F. Qu, N.B. Li, H.Q. Luo, Utilizing polyethyleneimine-capped silver nanoclusters as a new fluorescence probe for Sudan I–IV sensing in ethanol based on fluorescence resonance energy transfer, *Sens. Actuators B–Chem.* 193 (2014) 730–736.
- [29] S.T. Huang, L.F. Yang, N.B. Li, H.Q. Luo, An ultrasensitive and selective fluorescence assay for Sudan I and III against the influence of Sudan II and IV, *Biosens. Bioelectron.* 42 (2013) 136–140.
- [30] L.P. Wu, Y.F. Li, C.Z. Huang, Q. Zhang, Visual detection of Sudan dyes based on the plasmon resonance light scattering signals of silver nanoparticles, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5570–5577.
- [31] J. Rantanen, Process analytical applications of Raman spectroscopy, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 171–177.
- [32] P. Chen, A.G. Shen, X.D. Zhou, J.M. Hu, Bio-Raman spectroscopy: a potential clinical analytical method assisting in disease diagnosis, *Anal. Methods* 3 (2011) 1257–1269.
- [33] M. Diem, A. Mazur, K. Lenau, J. Schubert, B. Bird, M. Miljkovic, C. Krafft, J. Popp, Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging, *J. Biophotonics* 6 (2013) 855–886.
- [34] G.L. Owens, K. Gajjar, J. Trevisan, S.W. Fogarty, S.E. Taylor, B. Da Gama-Rose, P.L. Martin-Hirsch, F.L. Martin, Vibrational biospectroscopy coupled with multivariate analysis extracts potentially diagnostic features in blood plasma/serum of ovarian cancer patients, *J. Biophotonics* 7 (2014) 200–209.
- [35] R. Cicchi, A. Cosci, S. Rossari, D. Kapsokalyvas, E. Baria, V. Maio, D. Massi, V. De Giorgi, N. Pimpinelli, F. Saverio Pavone, Combined fluorescence-Raman spectroscopic setup for the diagnosis of melanocytic lesions, *J. Biophotonics* 7 (2014) 86–95.
- [36] Y.S. Li, J.S. Church, Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials, *J. Food Drug Anal.* 22 (2014) 29–48.
- [37] B. Sharma, R.R. Frontiera, A.I. Henry, E. Ringe, R.P. Van Duyne, SERS: materials, applications, and the future, *Mater. Today* 15 (2012) 16–25.
- [38] D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, J. Popp, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 27–54.

- [39] S. Pahlow, A. März, B. Seise, K. Hartmann, I. Freitag, E. Kämmer, R. Böhme, V. Deckert, K. Weber, D. Cialla, J. Popp, Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy, *Eng. Life Sci.* 12 (2012) 131–143.
- [40] E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, Quantifying SERS enhancements, *MRS Bull.* 38 (2013) 631–640.
- [41] D. Cialla, S. Pollok, C. Steinbrücker, K. Weber, J. Popp, SERS-based detection of biomolecules, *Nanophotonics* 3 (2013) 383–411.
- [42] W. Xie, S. Schlucker, Medical applications of surface-enhanced Raman scattering, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 5329–5344.
- [43] P. Negri, R.A. Dluhy, Ag nanorod based surface-enhanced Raman spectroscopy applied to bioanalytical sensing, *J. Biophotonics* 6 (2013) 20–35.
- [44] M.Z. Si, Y.P. Kang, Z.G. Zhang, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of methyl orange in Ag colloids prepared by electrolysis method, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2009) 6007–6010.
- [45] W. Cheung, I.T. Shadi, Y. Xu, R. Goodacre, Quantitative analysis of the banned food dye Sudan-1 using surface enhanced Raman scattering with multivariate chemometrics, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 7285–7290.
- [46] M.Z. Si, Y.P. Kang, R.M. Liu, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of three kinds of azo-dye molecules on silver nanoparticles prepared by electrolysis, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 5533–5537.
- [47] X. Zhou, Y. Fang, P. Zhang, A new substrate for surface enhanced Raman scattering of dye Sudan molecules, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 67 (2007) 122–124.
- [48] C.V. Di Anibal, L.F. Marsal, M.P. Callao, I. Ruisánchez, Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate analysis as a screening tool for detecting Sudan I dye in culinary spices, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 87 (2012) 135–141.
- [49] M.I. López, I. Ruisánchez, M.P. Callao, Figures of merit of a SERS method for Sudan I determination at traces levels, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 111 (2013) 237–241.
- [50] L. Zhang, P. Zhang, Y. Fang, An investigation of the surface-enhanced Raman scattering effect from new substrates of several kinds of nanowire arrays, *J. Colloid Interface Sci.* 311 (2007) 502–506.
- [51] L. Zhang, P. Zhang, Y. Fang, Magnetron sputtering of silver nanowires using anodic aluminum oxide template: a new active substrate of surface enhanced Raman scattering and an investigation of its enhanced mechanism, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 214–218.
- [52] M.-L. Zhang, X. Fan, H.-W. Zhou, M.-W. Shao, J.A. Zapien, N.-B. Wong, S.-T. Lee, A high-efficiency surface-enhanced Raman scattering substrate based on silicon nanowires array decorated with silver nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 1969–1975.
- [53] H. Hu, Z. Wang, S. Wang, F. Zhang, S. Zhao, S. Zhu, ZnO/Ag heterogeneous structure nanoarrays: photocatalytic synthesis and used as substrate for surface-enhanced Raman scattering detection, *J. Alloys Compd.* 509 (2011) 2016–2020.
- [54] A. Maerz, S. Trupp, P. Roesch, G.J. Mohr, J. Popp, Fluorescence dye as novel label molecule for quantitative SERS investigations of an antibiotic, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2625–2631.
- [55] A. März, T. Henkel, D. Cialla, M. Schmitt, J. Popp, Droplet formation via flow-through microdevices in Raman and surface enhanced Raman spectroscopy—concepts and applications, *Lab Chip* 11 (2011) .
- [56] A. März, B. Mönch, P. Rösch, M. Kiehntopf, T. Henkel, J. Popp, Detection of thiopurine methyltransferase activity in lysed red blood cells by means of lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LOC-SERS), *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2755–2761.
- [57] D. Cialla, U. Huebner, H. Schneidewind, R. Moller, J. Popp, Probing innovative microfabricated substrates for their reproducible SERS activity, *ChemPhysChem* 9 (2008) 758–762.
- [58] U. Huebner, R. Boucher, H. Schneidewind, D. Cialla, J. Popp, Microfabricated SERS-arrays with sharp-edged metallic nanostructures, *Microelectron. Eng.* 85 (2008) 1792–1794.
- [59] D. Cialla, J. Petschulat, U. Hübner, H. Schneidewind, M. Zeisberger, R. Mattheis, T. Pertsch, M. Schmitt, R. Möller, J. Popp, Investigation on the second part of the electromagnetic SERS enhancement and resulting fabrication strategies of anisotropic plasmonic arrays, *ChemPhysChem* 11 (2010) 1918–1924.
- [60] D. Cialla, K. Weber, R. Boehme, U. Huebner, H. Schneidewind, M. Zeisberger, R. Mattheis, R. Moeller, J. Popp, Towards multiple readout application of plasmonic arrays, *Beilstein J. Nanotechnol.* 2 (2011) 501–508.
- [61] U. Huebner, K. Weber, D. Cialla, H. Schneidewind, M. Zeisberger, H.G. Meyer, J. Popp, Fabrication and characterization of silver deposited micro fabricated quartz arrays for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS), *Microelectron. Eng.* 88 (2011) 1761–1763.
- [62] S. Tawfik, M. De Volder, D. Copic, S.J. Park, C.R. Oliver, E.S. Polsen, M.J. Roberts, A.J. Hart, Engineering of micro- and nanostructured surfaces with anisotropic geometries and properties, *Adv. Mater.* 24 (2012) 1628–1674.
- [63] A. Biswas, I.S. Bayer, A.S. Biris, T. Wang, E. Dervishi, F. Faupel, Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: techniques applications and future prospects, *Adv. Colloid Interfac* 170 (2012) 2–27.
- [64] J.J. Dumond, H.Y. Low, Recent developments and design challenges in continuous roller micro- and nanoimprinting, *J. Vac. Sci. Technol. B* 30 (2012) .
- [65] K.K. Hering, R. Möller, W. Fritzsche, J. Popp, Microarray-based detection of dye-labeled DNA by SERS using particles formed by enzymatic silver deposition, *ChemPhysChem* 9 (2008) 867–872.
- [66] T. Schüler, A. Steinbrück, G. Festag, R. Möller, W. Fritzsche, Enzyme-induced growth of silver nanoparticles studied on single particle level, *J. Nanopart. Res.* 11 (2009) 939–946.
- [67] K.K. Strelau, T. Schüler, R. Möller, W. Fritzsche, J. Popp, Novel bottom-up SERS substrates for quantitative and parallelized analytics, *ChemPhysChem* 11 (2010) 394–398.
- [68] Y. Yamamoto, H. Nishihara, K. Aramaki, Self-assembled layers of alkanethiols on copper for protection against corrosion, *J. Electrochem. Soc.* 140 (1993) 436–443.
- [69] C.S. Weisbecker, M.V. Merritt, G.M. Whitesides, Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids, *Langmuir* 12 (1996) 3763–3772.
- [70] B.J. Kennedy, S. Spaeth, M. Dickey, K.T. Carron, Determination of the distance dependence and experimental effects for modified SERS substrates based on self-assembled monolayers formed using alkanethiols, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 3640–3646.
- [71] P.E. Laibinis, G.M. Whitesides, D.L. Allara, Y.T. Tao, A.N. Parikh, R.G. Nuzzo, Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of normal-alkanethiols on the coinage metal-surfaces, Cu, Ag, Au, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 7152–7167.
- [72] R.D.C. Team, A language and environment for statistical computing (2011).
- [73] C.G. Ryan, E. Clayton, W.L. Griffin, S.H. Sie, D.R. Cousens, Snip, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative-analysis of pike spectra in geoscience applications, *Nucl. Instrum. Methods B* 34 (1988) 396–402.
- [74] Mevik B.-H, Wehrens R, Liland K.H, Partial Least Squares and Principal Component regression, (2011) . . R package version 2.3-0 <http://CRAN.R-project.org/package=pls>.
- [75] M.M. Walczak, C.K. Chung, S.M. Stole, C.A. Widrig, M.D. Porter, Structure and interfacial properties of spontaneously adsorbed normal-alkanethiolate monolayers on evaporated silver surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 2370–2378.
- [76] D. Enders, A. Pucci, Surface enhanced infrared absorption of octadecanethiol on wet-chemically prepared Au nanoparticle films, *Appl. Phys. Lett.* 88 (2006) 184104.
- [77] U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27, Nutrient Data Laboratory Home Page, 2014. <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.
- [79] V.E. de Oliveira, H.V. Castro, H.G.M. Edwards, L.F.C. de Oliveira, Carotenoids and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis, *J. Raman Spectrosc.* 41 (2010) 642–650.
- [80] J. Trebolazabala, M. Maguregui, H. Morillas, A. de Diego, J.M. Madariaga, Use of portable devices and confocal Raman spectrometers at different wavelength to obtain the spectral information of the main organic components in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits, *Spectrochim. Acta A* 105 (2013) 391–399.
- [81] S. Schlucker, A. Szeghalmi, M. Schmitt, J. Popp, W. Kiefer, Density functional and vibrational spectroscopic analysis of beta-carotene, *J. Raman Spectrosc.* 34 (2003) 413–419.

1.3. LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate [IH1]

Izabella J. Hidi, Anna Mühlig, Martin Jahn, Falk Liebold, Dana Cialla, Karina Weber und Jürgen Popp

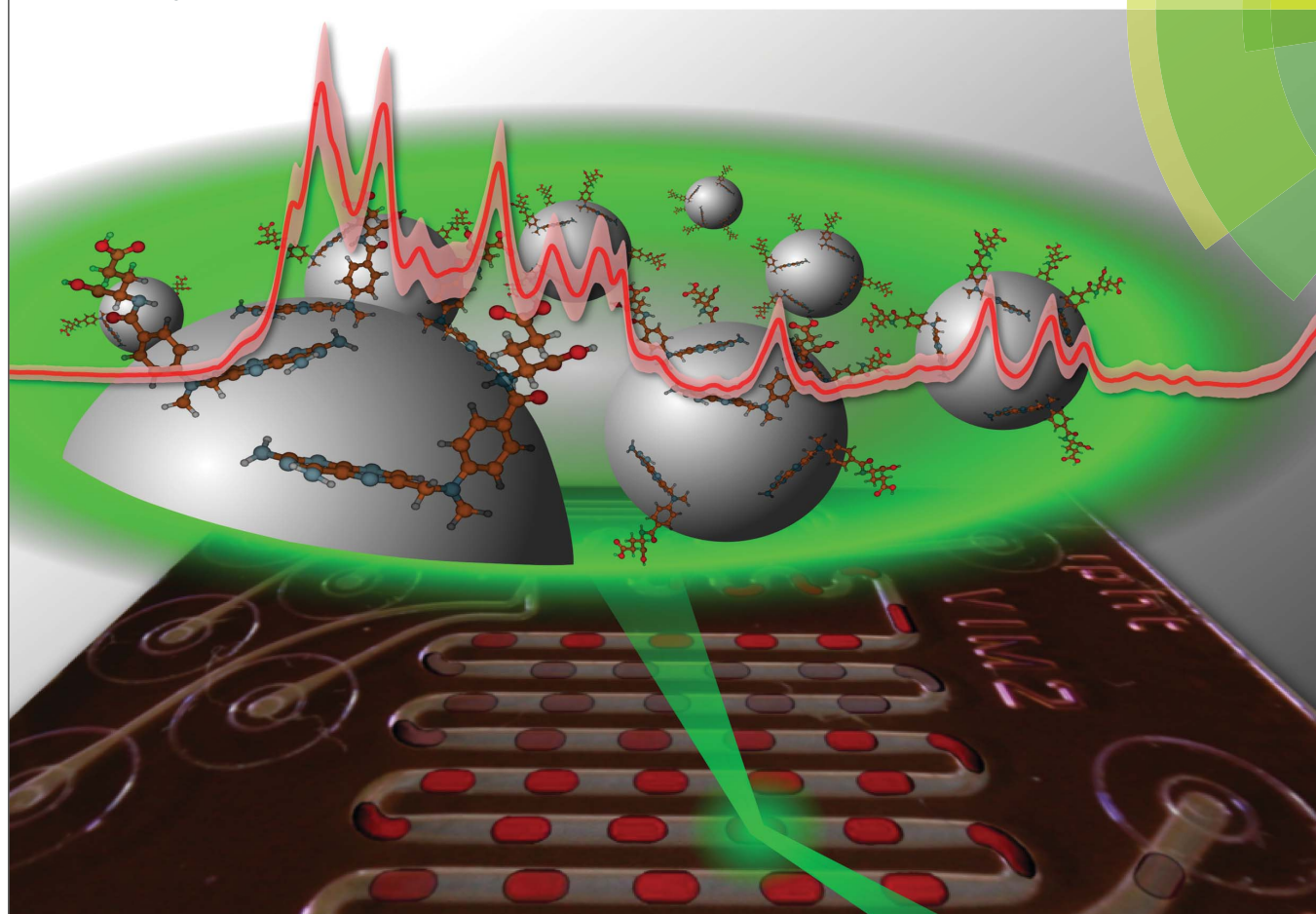
Anal. Methods, 2014, 6, 3943 – 3947

Reproduced with kind permission from The Royal Society of Chemistry,
Copyright © 2014.

<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/AY/c3ay42240b#!divAbstract>

Analytical Methods

www.rsc.org/methods



Themed issue: Clinical Diagnostics

ISSN 1759-9660



PAPER

J. Popp *et al.*

LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate

LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate

Cite this: *Anal. Methods*, 2014, 6, 3943I. J. Hidi,^{†a} A. Mühlig,^{†a} M. Jahn,^a F. Liebold,^b D. Cialla,^{ac} K. Weber^{ac} and J. Popp^{*ac}Received 14th December 2013
Accepted 6th March 2014

DOI: 10.1039/c3ay42240b

www.rsc.org/methods

Therapeutic drug monitoring is of major importance in the case of medication with a narrow therapeutic range as well as when pharmacokinetic/pharmacodynamic variability is suspected. Methotrexate (MTX), an antifolate antibiotic, proved to be toxic regardless of the chosen treatment schedule. In this contribution, a new analytical method was used for the detection of MTX. A linear response was achieved in the 0.2–2 μM concentration range, with a limit of detection \approx 0.17 μM . The lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LOC-SERS) approach combines the fingerprint specificity and high sensitivity of SERS with the high sample throughput of a microfluidic platform. Additionally, it is shown that due to the chemical affinity of the MTX molecules towards Ag nanostructures, the pH value of the solving medium highly affects the obtained SERS signal. More specifically, SERS signals with well resolved bands can be obtained from deprotonated MTX molecules due to their binding to the metallic surface via the amine groups of the aromatic ring.

Introduction

Today's cancer therapy makes it essential to monitor and optimize the concentration of the administered medication in blood or other biological fluids.^{1–4} A narrow therapeutic range, variability of the patient's characteristics due to age, physiology and/or disease are only a few parameters which may strongly influence the pharmacokinetic/pharmacodynamic outcome of a given drug. For example, the antifolate methotrexate (MTX) (see the chemical structure in Fig. 1), administered in both low-⁵ and high-dosage^{6–8} (LD-MTX and HD-MTX) treatment schemes, can

exhibit high toxicity, overdose leading to mortality.⁹ Furthermore, the therapeutic range of MTX is in the concentration range of micromolar, the exact value being strongly dependent on whether it is administered as a single agent or in combination with other drugs.¹⁰ The plasma MTX concentration at 42 hours after the start of HD-MTX infusion should be \leq 1.0 μM , high risk toxic adverse effects being associated with concentrations \geq 10 μM .^{6,11,12} Therefore, from the clinical point of view concerning HD-MTX, it is essential to detect the plasma MTX concentration between 10 μM and 0.1 μM .

In order to prevent an unwanted clinical outcome, therapeutic drug monitoring (TDM) is employed in clinical settings. Due to TDM the determination of the effective and, at the same time, safe dosage is possible. The concentration in biological fluids is commonly screened with various techniques, such as immunoassays,^{13,14} gas or high pressure distribution chromatographic devices^{15–18} and the dosage of the medication is regulated to the optimal therapeutic region by taking into account the patient characteristics.

However, even if chromatographic methods show high specificity and sensitivity, they are time consuming and expensive, require highly specialized personnel and more than one device in order to assess the drug concentrations. Therefore, the development of a new method with less technical complexity and faster analysing times is needed.

An innovative approach for the point-of-care (POC) diagnostic is the LOC-SERS (lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy) technique.^{19–22} Raman spectroscopy offers high specificity providing information concerning the molecular vibrations of the target molecule. As a result, labelling is not required as compared, e.g., with fluorescence spectroscopy.

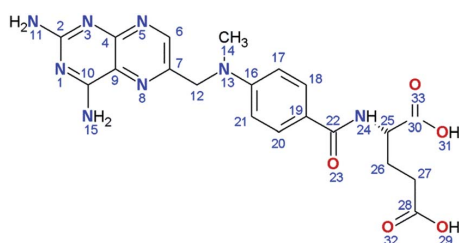


Fig. 1 Chemical structure of MTX.

^aFriedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07745 Jena, Germany. E-mail: juergen.popp@ipht-jena.de^bAnalytik Jena AG, Konrad-Zuse-Straße 1, 07745 Jena, Germany^cLeibniz-Institute of Photonic Technology Jena, Albert-Einstein-Str. 9, 07745 Jena, Germany[†] These authors contributed equally.

However, the intensity of the inelastically scattered light is several orders of magnitude smaller than the excitation and therefore the efficiency is extremely poor. As a consequence, SERS is more appealing for medical diagnostics.^{23–25} It gains its advantage due to a signal amplification effect of up to 8 orders of magnitude.²⁶ This is a result of the interaction of the analyte molecules with the intense local electromagnetic fields generated at the surface of metallic nanostructures.^{26–28} Furthermore, SERS measurements carried out using a microfluidic device with a liquid/liquid segmented flow, where analyte-containing droplets are formed in a carrier fluid like oil, show great potential for bioanalytics.^{19–22} To be more precise, minimal sample amounts are required and only short analysis times are needed, leading to significant cost reduction.

In this contribution, results of MTX determination using an aqueous solution by means of LOC-SERS will be presented. To the best of our knowledge, this is the first study to prove that SERS offers the possibility of detecting MTX in the target therapeutic concentration range (2 μM to 0.2 μM).

Materials and methods

Chemicals and reagents

The methotrexate hydrate powder used during measurements was purchased from Sigma Aldrich and meets the U.S. Pharmacopeial Convention testing specifications. Other reagents, such as mineral oil used for the realization of a segmented flow profile, KOH and KCl, HCl, as well as silver nitrate and sodium citrate were of analytical grade and were also purchased from the same provider.

Sample preparation

Due to the low water solubility of MTX, solutions with different pH values were prepared for preliminary tests. A first solution of pH 10 was prepared by dissolving the MTX powder in a KOH solution of 1 mM concentration. For achieving pH 12 a 150 mM KOH solution was used. Finally, by adding HCl (1 M) to the last solution, pH 2 was achieved.

For LOC-SERS measurements the 150 mM KOH solution was chosen. A stock solution of 1 mM MTX was prepared and further diluted in order to obtain the desired concentrations (10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M).

The Ag colloid was prepared by reducing silver nitrate with sodium citrate according to the Lee–Meisel protocol.²⁹ Transmission and scanning electron micrographs of this type of nanoparticle can be found elsewhere.^{27,30,31}

Instrumentation

Extinction spectra of the as-prepared colloidal suspension, of MTX, as well as of different mixtures (*i.e.* colloid–buffer with pH 2, 10 and 12, colloid–MTX) were recorded with a Jasco V650 diode-array spectrophotometer in the wavelength range of 850–230 nm.

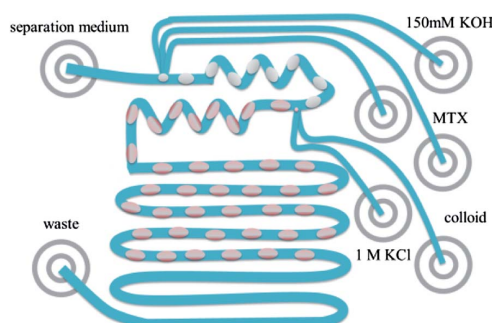
The reference Raman spectrum of the target analyte was recorded using as excitation a 785 nm laser line of a commercially available WITec Raman microscope (WITec GmbH, Ulm,

Germany). The average power at the sample surface was 80 mW and 10 accumulated spectra of 5 s integration time were acquired.

Before the actual LOC-SERS measurements, preliminary tests were performed in order to assess the optimal measurement conditions. Therefore, for every measurement equal amounts of colloid and buffer/analyte solutions were mixed and, finally, 1 M KCl was added for inducing the aggregation of nanoparticles (mixing ratio: 1 : 1 : 0.1). The mixtures were pipetted in quartz cuvettes. For spectra acquisition, a commercially available WITec Raman microscope (WITec GmbH, Ulm, Germany) with an Ar⁺ laser (514 nm) and 2 mW incident laser power at the sample surface was used. The same objective (Nikon 20 \times , N.A. 0.4) was employed for focusing the laser as well as for collecting the backscattered light. For acquisition, 10 accumulated spectra of 5 s integration time were recorded.

For LOC-SERS measurements, a $16 \times 25 \text{ mm}^2$ sized all-glass microfluidic chip with six inlet ports to add the reagents was employed (Scheme 1). A more detailed description can be found elsewhere.^{32,33} The aqueous droplet segments were generated with MTX and the 150 mM KOH solution at the first dosing unit. The citrate reduced Ag colloid and its activation agent, 1 M potassium chloride, was injected into these segments *via* a second dosing unit. The reproducible addition of analytes is provided by a computer controlled neMESYS Cetoni high performance syringe pump system. During measurements, the applied flow rates were fixed for the carrier medium mineral oil ($0.01 \mu\text{L s}^{-1}$), colloidal solution ($0.009 \mu\text{L s}^{-1}$) and potassium chloride ($0.001 \mu\text{L s}^{-1}$). In order to obtain different concentrations of the analyte, the flow rates of the analyte solution (0, 0.002351, 0.004703, 0.0093, and $0.014 \mu\text{L s}^{-1}$) and mixing 150 mM KOH (0.014, 0.01165, 0.0093, 0.0047, and $0 \mu\text{L s}^{-1}$) were changed. Therefore, dilutions occurred within the droplet created at the first dosing unit by mixing MTX solution with the 150 mM KOH medium. This resulted in the following in-droplet concentrations of the analyte before mixing in the colloid and KCl: 1.68×10^{-x} M, 3.36×10^{-x} M, 6.65×10^{-x} M and $1.00 \times 10^{-(x-1)}$ M, where $x = 5, 6$, and 7.

In order to get optimal results, the microfluidic chip was mounted on the microscope table of a HR 800 LabRam spectrometer (Horiba Jobin-Yvon). The frequency doubled Nd:YAG laser (excitation wavelength: 532 nm) was focused into the



Scheme 1 LOC-SERS device.

Paper

microchannel of the microfluidic chip through an inverse microscope (Olympus IX 71 with an Olympus 20 \times UPlan FLN objective). The backscattered SERS signal was collected through the same objective. During measurements, a 300 lines per mm grating (resolution *ca.* 10 cm⁻¹) and a back-illuminated CCD camera (1024 \times 512 pixels) were employed. Spectra were recorded continuously with integration times of 1 s during continuous flow. The power at the sample surface was 10 mW; higher laser power being necessary, as compared with the cuvette measurements, due to the dynamic flow. The time needed in order for an aqueous and an oil phase to pass through the laser spot is around 8 s. Therefore, alternating SERS spectra of analyte containing droplets, spectra of the oil phase or spectra with contribution from both phases are recorded.³⁴ The oil spectra are further used for wavelength calibration of the subsequent SERS spectra.

Results and discussion

UV-Vis absorption characteristics

According to the absorption profile (see Fig. 2) of the as prepared silver colloids, the plasmon resonances are located at \sim 425 nm. As a result of the addition of 150 mM KOH solution (pH 12) as well as 1 M HCl (pH 2) the absorption band is broadened. This is a consequence of the aggregation of the Ag nanoparticles.

Concerning MTX, its extinction profile shows three absorption peaks. This is due to the strong $\pi \rightarrow \pi^*$ and $\sigma \rightarrow \sigma^*$ electronic transitions.³⁵ The bands located at 257 and 372 nm are due to the pteridine group, the first one is ascribed to the 1L_a while the second one to the 1L_b transition. The 308 nm absorption is due to the *p*-amino benzoylglutamic moiety.^{36,37} When the colloidal solution and the analyte are mixed, broadening of the 372 nm band occurs due to the contribution of the plasmon resonances.

Cuvette based SERS measurements

The reference spectrum of the MTX powder (Fig. 3) presents multiple bands, the vibrational analysis being previously

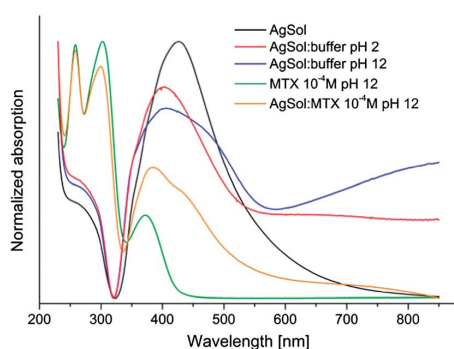


Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of the Ag colloid (black); Ag colloid–buffer with pH 2 (red); Ag colloid–buffer with pH 12 (blue); (MTX/pH 12) 10⁻⁴ M (green) and Ag colloid–(MTX/pH 12) 10⁻⁴ M (orange) solutions.

View Article Online

Analytical Methods

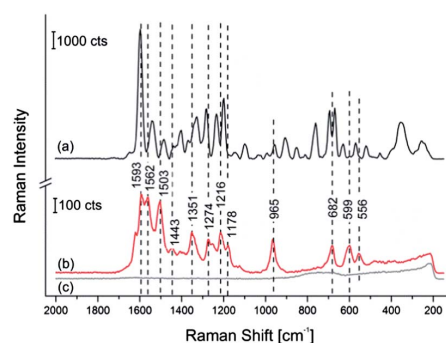


Fig. 3 Reference Raman spectrum measured on MTX powder @ 785 nm (a); SERS spectra of MTX 0.4 mM pH 12 (b) and the background signal (c) of the colloid mixed with 150 mM KOH and 1 M KCl (1 : 1 : 0.1) @ 514 nm.

presented by Ayyappan *et al.*³⁵ Compared to this, the SERS signal of the MTX solution with pH 12 is slightly different. This may be caused by the deprotonation induced by the addition of KOH molecules. The deprotonation may occur at the O29 and/or at the O31 site (see Fig. 1) due to the acidic activity of the carboxyl (COOH) group.

An additional explanation could be given by considering that the orientation of the molecule at the metallic nanoparticle's surface also plays an important role. It is well known that vibrational modes perpendicular to the surface are significantly enhanced when compared to the ones parallel to it.^{38–40} Furthermore, generally, the bonding of molecules to the silver surface can happen either through the lone pair electrons of the nitrogen or oxygen atoms.⁴¹

In the case of the deprotonated MTX, the attachment to the Ag nanoparticles could be *via* the amino groups. This is confirmed by the shift of the 1327 cm⁻¹ band, ascribed to the NH₂ deformation, by 19 cm⁻¹. Additionally, the pteridine ring is oriented parallel to the metallic surface suggested by the disappearance of the 1403 cm⁻¹ band assigned to C=N vibration (see the inset of Fig. 4). Thus, when compared with the Raman spectrum, the ring breathing mode of the aromatic ring at 965 cm⁻¹ is strongly enhanced.

Concerning the similarities between the two spectra under discussion, one could argue that several bands of the SERS signal are in good accordance with the ones of the reference. More exactly, in the 1600–1300 cm⁻¹ wavenumber region the 1593 cm⁻¹ band can be ascribed to the scissoring of the NH₂ group while the one located at 1351 cm⁻¹ to the CH₂ scissoring vibrations. Furthermore, in the 1300–900 cm⁻¹ spectral region, the CH₂ wagging and C–NH₂ vibrations give rise to bands located at 1178 and 1216 cm⁻¹, respectively.

As already mentioned, SERS spectra were acquired for MTX solutions with different pH values. In Fig. 4 the SERS spectra of the MTX solutions with different pH values are presented. In an acidic environment the spectra have a small number of poorly resolved bands. As a result of HCl addition, protonation of the amine groups at the N15H₂ as well as N11H₂ affects the

Analytical Methods

View Article Online

Paper

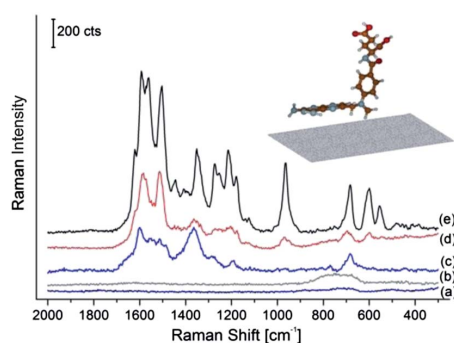


Fig. 4 SERS spectra of the pH adjusted MTX solutions (0.4 mM): colloid–buffer with pH 2–KCl (a); colloid–buffer with pH 12–KCl (b); colloid–(MTX/pH 2)–KCl (c); colloid–(MTX/pH 10)–KCl (d) and colloid–(MTX/pH 12)–KCl (e). Inset: orientation of the MTX molecule on the metal surface.

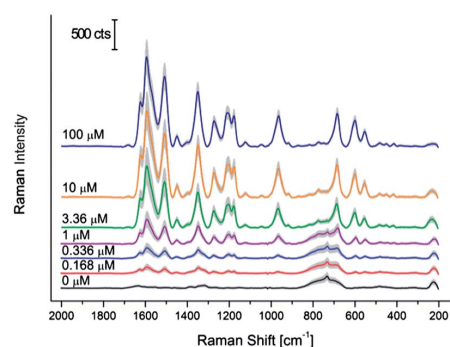


Fig. 5 Concentration dependency of the SERS signal of MTX measured by LOC-SERS.

chemical affinity of the target molecule towards the metallic surface. Therefore, the number of MTX molecules at the metallic surface is low, leading to a poor SERS signal.

For alkaline conditions, by increasing the pH from 10 to 12 the Raman signal is significantly improved. This may be due to the better steric orientation of the nitrogen atoms N11 and/or N15 to the metallic surface. As the number of deprotonated MTX molecules increases the number of Ag–N binding sites increases, leading to the increment of the SERS signal.

Concerning the future experiments for detecting the target analyte out of biological fluids, pH adjustment will be possible by adding a buffer *via* one of the ports of the microfluidic chip. More exactly, in the case of blood plasma the starting pH value is slightly basic (~ 7.4). Based on pre-experiments, a buffer will be defined in order to reach an in-droplet pH value of 12.

LOC-SERS measurements

In order to obtain different droplet concentrations of the target analyte a flow profile was employed in the microfluidic channel. Three stem solutions of 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M concentrations were injected in order to assess the limit of detection (LOD). As mentioned before, due to the mixing of the MTX solution with the solvent within the droplet formed at the first dosing port the measured concentrations are between 0.16 μM and 100 μM . In Fig. 5 one can see the plot of the mean spectra and their double standard deviation of selected concentration steps. Intermediate concentrations are not shown for the sake of clarity. According to this, spectral features characteristic to MTX are still present at a concentration of 0.17 μM .

For better visualisation, the Lorentz fitted peak area of the 965 cm^{-1} band was plotted against the in-droplet concentration of MTX (see Fig. 6). Therefore, one may observe that a linear dependency exists in the 0.2–2 μM region, with an LOD ~ 0.17 μM . This concentration domain is useful for the clinical practice when HD-MTX treatments are aimed. For

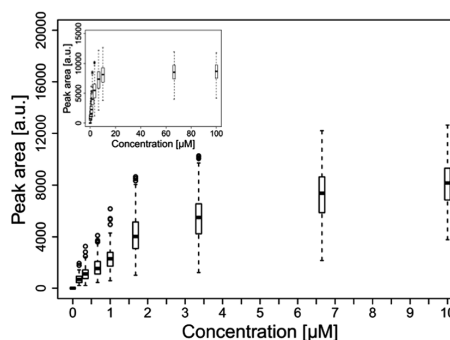


Fig. 6 Lorentz fitted peak area of the 965 cm^{-1} band against the in-droplet concentration of the MTX.

concentrations higher than 10 μM the signal reaches saturation. This may be due to the fact that the surface of the Ag colloids is limited. Therefore, the increment of the number of MTX molecules does not lead to higher signal intensities.

Conclusions

In this study it was shown that when MTX is dissolved in a 150 mM KOH solution the deprotonated molecules bind to the silver nanoparticles *via* amine groups with the pteridine ring oriented parallel to the surface. Additionally, the pH value of the MTX solution has a strong influence on the chemical affinity of the target molecules towards the silver surface. SERS spectra with well resolved bands could be recorded when the solvent had an alkaline character. Furthermore, it was proven that LOC-SERS technology is a promising technique for the detection of biologically relevant molecules in the target therapeutic range. More exactly, in the case of MTX concentrations down to 0.17 μM were detected. Additionally, the Raman signal *vs.* MTX concentration showed linearity in the 0.2–2 μM window, the concentration range relevant for HD-MTX treatment schedules.

Acknowledgements

The funding of the PhD project of I.J. Hidi within the framework “Carl-Zeiss-Strukturmaßnahme” is gratefully acknowledged. The projects “QuantiSERS” and “Jenaer Biochip Initiative 2.0” within the framework “InnoProfile Transfer – Unternehmen Region” are supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF). We thank the microfluidic group of the IPHT for providing the lab-on-a-chip devices for the measurements. Additionally, the help of Konstanze Olschewskithe with data processing is gratefully acknowledged.

Notes and references

- 1 V. Escudero-Ortiz, J. J. Pérez-Ruixo and B. Valenzuela, *Ther. Drug Monit.*, 2013, **35**, 796–802.
- 2 D. J. Cline, H. Zhang, G. D. Lundell, R. L. Harney, H. K. Riaz, J. Jarrah, Y. Li, M. Miyazaki, J. B. Courtney, I. Baburina and S. J. Salamone, *Ther. Drug Monit.*, 2013, **35**, 809–815.
- 3 R. E. Aarnoutse, J. M. Schapiro, C. A. Boucher, Y. A. Hekster and D. M. Burger, *Drugs*, 2003, **63**, 741–753.
- 4 G. L. Owens, K. Gajjar, J. Trevisan, S. W. Fogarty, S. E. Taylor, B. Da Gama-Rose, P. L. Martin-Hirsch and F. L. Martin, *J. Biophotonics*, 2013, DOI: 10.1002/jbio.201300157.
- 5 B. N. Cronstein, *Pharmacol. Rev.*, 2005, **57**, 163–172.
- 6 B. C. Widemann and P. C. Adamson, *Oncologist*, 2006, **11**, 694–703.
- 7 B. L. Asselin, M. Devidas, C. Wang, J. Pullen, M. J. Borowitz, R. Hutchison, S. E. Lipshultz and B. M. Camitta, *Blood*, 2011, **118**, 874–883.
- 8 H. Inaba, R. B. Khan, F. H. Laningham, K. R. Crews, C. H. Pui and N. C. Daw, *Ann. Oncology*, 2008, **19**, 178–184.
- 9 I. Sinicina, B. Mayr, G. Mall and W. Keil, *J. Rheumatol.*, 2005, **32**, 2009–2011.
- 10 L. Lennard, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1999, **47**, 131–143.
- 11 K. R. Crews, T. Liu, C. Rodriguez-Galindo, M. Tan, W. H. Meyer, J. C. Panetta, M. P. Link and N. C. Daw, *Cancer*, 2004, **100**, 1724–1733.
- 12 K. R. Crews, Y. Zhou, J. L. Pauley, S. C. Howard, S. Jeha, M. V. Relling and C.-H. Pui, *Cancer*, 2010, **116**, 227–232.
- 13 C. Ritzmo, F. Albertioni, K. Cosic, S. Söderhäll and S. Eksborg, *Ther. Drug Monit.*, 2007, **29**, 447–451.
- 14 S. Marubashi, H. Nagano, S. Kobayashi, H. Eguchi, Y. Takeda, M. Tanemura, K. Umeshita, M. Monden, Y. Doki and M. Mori, *J. Clin. Pharmacol.*, 2010, **50**, 705–709.
- 15 E. den Boer, S. G. Heil, B. D. van Zelst, R. J. W. Meesters, B. C. P. Koch, M. L. te Winkel, M. M. van den Heuvel-Eibrink, T. M. Luider and R. de Jonge, *Ther. Drug Monit.*, 2012, **34**, 432–439.
- 16 C. Sottani, G. Poggi, F. Melchiorre, B. Montagna and C. Minoia, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2013, **915–916**, 71–78.
- 17 S. Belz, C. Frickel, C. Wolfrom, H. Nau and G. Henze, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 1994, **661**, 109–118.
- 18 R. J. W. Meesters, E. den Boer, R. A. A. Mathot, R. de Jonge, R. J. van Klaveren, J. Lindemans and T. M. Luider, *Bioanalysis*, 2011, **3**, 1369–1378.
- 19 A. Walter, A. Marz, W. Schumacher, P. Rosch and J. Popp, *Lab Chip*, 2011, **11**, 1013–1021.
- 20 A. Marz, B. Monch, P. Rosch, M. Kiehntopf, T. Henkel and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 2755–2761.
- 21 A. Pallaoro, M. R. Hoonejani, G. B. Braun, C. Meinhart and M. Moskovits, *J. Nanophotonics*, 2013, **7**, 073092.
- 22 X. Lu, D. R. Samuelson, Y. Xu, H. Zhang, S. Wang, B. A. Rasco, J. Xu and M. E. Konkel, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 2320–2327.
- 23 M. Salehi, D. Steinigeweg, P. Ströbel, A. Marx, J. Packeisen and S. Schlücker, *J. Biophotonics*, 2013, **6**, 785–792.
- 24 U. S. Dinis, G. Balasundaram, Y. T. Chang and M. Olivo, *J. Biophotonics*, 2013, DOI: 10.1002/jbio.201300084.
- 25 P. Negri and R. A. Dluhy, *J. Biophotonics*, 2013, **6**, 20–35.
- 26 E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin, in *Principles of Surface-enhanced Raman Spectroscopy*, eds. E. C. L. Ru and P. G. Etchegoin, Elsevier, Amsterdam, 2009, DOI: 10.1016/B978-0-444-52779-0.00010-6, pp. 185–264.
- 27 D. Cialla, A. März, R. Böhme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 27–54.
- 28 E. C. Le Ru, S. A. Meyer, C. Artur, P. G. Etchegoin, J. Grand, P. Lang and F. Maurel, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 3903–3905.
- 29 P. C. Lee and D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3391–3395.
- 30 D. Steinigeweg and S. Schlucker, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 8682–8684.
- 31 C. De Bleye, E. Dumont, E. Rozet, P. Y. Sacré, P. F. Chavez, L. Netchacovitch, G. Piel, P. Hubert and E. Ziemons, *Talanta*, 2013, **116**, 899–905.
- 32 T. Henkel, T. Bermig, M. Kielpinski, A. Grodrian, J. Metze and J. M. Köhler, *Chem. Eng. J.*, 2004, **101**, 439–445.
- 33 A. Marz, K. R. Ackermann, D. Malsch, T. Bocklitz, T. Henkel and J. Popp, *J. Biophotonics*, 2009, **2**, 232–242.
- 34 A. März, T. Bocklitz and J. Popp, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 8337–8340.
- 35 S. Ayyappan, N. Sundaraganesan, V. Aroulmoji, E. Murano and S. Sebastian, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2010, **77**, 264–275.
- 36 G. Seng, J. Bolard, L. Chinsky and P. Y. Turpin, *J. Raman Spectrosc.*, 1982, **13**, 100–102.
- 37 Y. Ozaki, R. W. King and P. R. Carey, *Biochemistry*, 1981, **20**, 3219–3225.
- 38 J. E. Pemberton, M. A. Bryant, R. L. Sobocinski and S. L. Joa, *J. Phys. Chem.*, 1992, **96**, 3776–3782.
- 39 X. Gao, J. P. Davies and M. J. Weaver, *J. Phys. Chem.*, 1990, **94**, 6858–6864.
- 40 H. Grabhorn and A. Otto, *Vacuum*, 1990, **41**, 473–475.
- 41 M. Baia, L. Baia, W. Kiefer and J. Popp, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 17491–17496.

**1.4. Droplet based microfluidics: spectroscopic
characterization of levofloxacin and its SERS detection
[IH2]**

Izabella J. Hidi, Martin Jahn, Karina Weber, Dana Cialla-May und Jürgen Popp

Phys. Chem. Chem. Phys., 2015, 17, 21236 – 21242

Reproduced with kind permission from the PCCP Owner Societies,
Copyright © 2015.

<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2015/CP/C4CP04970E#!divAbstract>



PCCP

PAPER

View Article Online
View Journal | View IssueCite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2015, 17, 21236

Droplet based microfluidics: spectroscopic characterization of levofloxacin and its SERS detection

I. J. Hidi,^a M. Jahn,^a K. Weber,^{ab} D. Cialla-May^{*ab} and J. Popp^{ab}Received 29th October 2014,
Accepted 16th January 2015

DOI: 10.1039/c4cp04970e

www.rsc.org/pccp

Levofloxacin (Levo), a second generation fluoroquinolone, has both clinical and environmental relevance. Therefore, the implementation of fast, robust and cost effective techniques for its monitoring is required. Here, its spectroscopic characterization and its detection in aqueous environment were carried out using surface enhanced Raman spectroscopy combined with droplet based microfluidics. The Levo molecule interacts with the silver nanoparticles via the carboxylate group and it adopts an upright or slightly tilted orientation. Furthermore, it is shown that the presence of Cl^- ions has a strong influence on the enhancement efficiency of the Raman signal of the target molecule. Thus, for the determination of the limit of detection (LOD) the measurements were carried out in the absence of any electrolytes. The estimated LOD is $\sim 0.8 \mu\text{M}$ and the linear dynamic window ranges between $1\text{--}15 \mu\text{M}$. These results were achieved after the normalization of the SERS signal to the Raman mode at 230 cm^{-1} . This band was attributed to the $\nu(\text{Ag-O})$ stretching and it accounts for the Levo molecules in the first layer on the Ag nanoparticles.

Introduction

Levofloxacin (Levo), also known as Levaquin or Tavanic, is a second generation fluoroquinolone widely used against infections caused by both gram negative and gram positive bacteria.^{1–4} Similar to most antibiotics, the drug has concentration dependent bacteria killing properties. Thus, discussions are on-going concerning whether it should be administered as single high dosage or multiple low dosages.⁵ Furthermore, the drug undergoes limited metabolism in the human body. More than 85% of the administered dose is eliminated in human urine as unchanged drug. The normal Levo concentrations measured in urine are around 1 mM after 6 hours from the administration of a 500 mg dose and drop to $1 \mu\text{M}$ after 72 hours.^{6–9} This results in the undesired presence of the antibiotic in surface waters, wastewaters, sediments and ground water worldwide.^{10–12} Therefore, the monitoring of Levo is of high importance for both clinical and environmental purposes.

The gold standard to detect Levo is chromatography coupled with different detection methods, such as fluorescence or mass spectrometry.^{9,13,14} In spite of the great technological advance, chromatographic methods are available only in large medical

and academic centres and reference laboratories due to the complexity of these methods. Therefore, a less complex and more readily available detection method is required.

The combination of microfluidic platforms with surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) gained interest in the scientific community during the last years.^{15–19} The method combines the fingerprint specificity of Raman spectroscopy^{20–22} with the high sensitivity resulting from the excitation of plasmon resonances of the metallic nanoparticles.^{22–24} Furthermore, high sample throughputs are achieved when instead of the conventional flow-through devices droplet based platforms are employed. Additionally, it was shown that quantitative detection with high reliability can be carried out either by using an isotope edited internal standard²⁵ or by employing the target analyte itself as a standard.²⁶ Therefore, the technique presents a high potential for online drug monitoring.

Before detecting biologically relevant molecules in complex matrices, an understanding of the fundamental spectroscopic characteristics of the pure analytes is necessary. Several studies have been published concerning the vibrational characterization of different quinolones.^{27–30} Among these, Neugebauer *et al.*²⁷ focused on the vibrational spectroscopic characterization of norfloxacin, whereas Gunasekaran *et al.*²⁹ performed the vibrational analysis as well as the description of the electronic structure and nonlinear properties of Levo. Both works provide valuable details, however, none is going beyond the conventional Raman or Fourier transform infrared spectroscopy.

^a Friedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07745 Jena, Germany

^b Leibniz Institute of Photonic Technology Jena, Albert-Einstein-Str. 9, 07745 Jena, Germany. E-mail: dana.cialla-may@uni-jena.de

Concerning the detection of quinolones by means of SERS, the adsorption behaviour of pefloxacin (a 3rd generation quinolone never approved for clinical practice) on silver colloids prepared by the Creighton method was presented by Lecomte *et al.*³⁰ However, the preparation of the employed silver nanoparticles has to be carried out in the presence of an ice bath and the resulted colloids are known to be weakly stable.³⁰ Hence, this would present a high limitation for the online monitoring of any drug.

To the best of our knowledge, this is the first time when Levo is detected by means of SERS and insights concerning its adsorption behaviour and orientation on the surface of Ag metallic nanoparticles are provided. Here, silver nanoparticles were produced at room temperature according to the Leopold-Lendl protocol.³¹ Furthermore, the detection in purified water by means of lab-on-a-chip SERS (LOC-SERS) is also carried out. The linearity of the SERS signal vs. the in droplet concentration of the target molecule is improved by using the Raman mode due to the Ag–O vibration located at 230 cm^{-1} as a standard.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Levo (HPLC, 98%), silver nitrate (ACS reagent, $\geq 99\%$), hydroxylamine hydrochloride (ReagentPlus, 99%) and sodium hydroxide have been purchased from Sigma Aldrich and used as received.

Sample preparation

Stock solutions of 1 mM concentration of Levo were prepared by solving the appropriate quantity of powder in purified water. The solutions were stored in the fridge at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and used within one week. Working solutions of 10^{-5} and 10^{-4} M were obtained by diluting the stock solutions with purified water and used on the day of preparation.

The silver colloids were prepared according to the Leopold-Lendl protocol.³¹ Briefly, 0.1 mmol silver nitrate was added to a mixture of hydroxylamine hydrochloride (0.15 mmol) and sodium hydroxide (0.3 mmol) under vigorous stirring. The solution turned instantaneously to grey-yellow colour. Stirring was continued for 10 s.

Instrumentation

UV-Vis absorption spectra were recorded in the 200–800 nm spectral range with a Jasco V650 diode array spectrophotometer. The acquisition speed was set to 200 nm min^{-1} with a spectral resolution of 1 nm.

For Raman, SERS and LOC-SERS measurements a WITec Raman microscope (WITec GmbH, Ulm, Germany) was used. As excitation a continuous wave diode-pumped solid-state laser with a wavelength of 514 nm and a maximum output power of 100 mW measured before the objective has been employed (Cobolt™). The same objective (Zeiss EC “Epiplan” DIC, $20\times$, N.A. 0.4) was used for focusing the laser beam and collecting the backscattered light. During measurements a 600 lines per mm grating was employed

with a spectral resolution of $\sim 5\text{ cm}^{-1}$. The detection was carried out with a thermo-electric cooled (down to $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) CCD detector with 1024×127 active pixels and a pixel size of $26\text{ }\mu\text{m} \times 26\text{ }\mu\text{m}$.

In the case of the reference Raman spectra of Levo powder and saturated aqueous solution the laser power at the sample surface was set to 2 and 95 mW, respectively. The plotted spectra are the average of five acquisitions with an integration time of 5 s each. Concerning the SERS spectra acquired in cuvettes a laser power of 35 mW and 1 s integration time with ten acquisitions was chosen.

In order to determine the limit of detection of Levo in aqueous solution a microfluidic platform (see Fig. 1) was employed. A detailed description of the platform has been published elsewhere.²⁵ Briefly, the glass chip has six different inlets and one outlet. All reagents are pumped into the chip through a computer controlled pump system (neMESYS Cetoni). At the first unit Levo/ H_2O droplets are generated in the continuous phase of the mineral oil. At the second unit the Ag nanoparticles and the 1 M KCl solution or H_2O are dosed into the already existing droplets. The mixing of the analytes is assured by the two meandering channels. Furthermore, the microchannels were functionalized with octadecyltrichlorosilane in order to obtain a hydrophobic surface. As a result, a minimum wettability of the aqueous droplets is achieved leading to the exclusion of memory effects usually characteristic for flow through microfluidic platforms. The flow rates of mineral oil (10 nl s^{-1}), Ag nanoparticles (9 nl s^{-1}) and 1 M KCl- H_2O (2 nl s^{-1}) were kept constant during the measurement.

In order to have different in-droplet concentrations, the flow rates at the two ports of the droplet generator unit have been varied as follows: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 nl s^{-1} for Levo and 14, 13, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 0 nl s^{-1} for H_2O . For LOC-SERS measurements the chip was mounted on the microscope table. The SERS spectra were acquired continuously with 1 s integration time in the third channel. For every concentration step 1200 spectra were recorded containing pure droplet, pure mineral oil and also mixed spectra.

The theoretical Raman spectrum was calculated by employing the density functional theory (DFT) method. The theoretical frequencies were determined by using the B3LYP functional, 6-31G(d,p) basis set and a scaling factor of 0.97. The vibrational modes were assigned with the help of the Gauss-View molecular visualization program package.³²

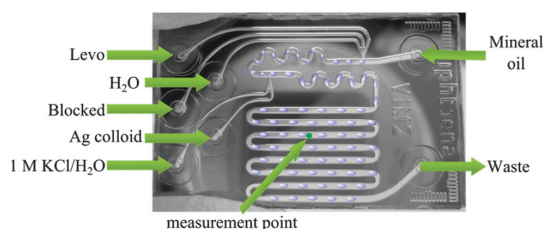


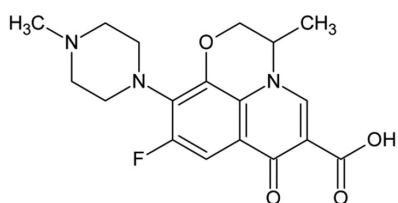
Fig. 1 Picture of the droplet based microfluidic chip used for LOC-SERS measurements together with the depiction of the droplets and the inlets.

Results and discussions

Spectroscopic characterization of Levo

The chemical structure of Levo (full name: (*S*)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-7*H*-pyrido[1,2,3-*de*]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid) is depicted in Scheme 1. Its main backbone is formed by the quinolone ring system having attached a fluorine atom and a piperazine moiety. The first one provides increased potency against organisms while the second one is responsible for pseudomonal activity.²⁸ The molecule exists as a zwitterion in the aqueous phase at the neutral pH range ($pK_{a1} = 6.02$ and $pK_{a2} = 8.15$)^{33,34} due to the presence of both anionic (carboxylic group) and cationic (piperazine ring) groups.

In Fig. 2 the reference Raman spectra measured on Levo powder and in the saturated aqueous solution is shown together with its calculated spectrum. In the case of the powder, the signal shows a high number of well-defined Raman modes. Most of the Raman bands involve the vibration of several atoms, their assignment to particular vibrational modes



Scheme 1 Chemical structure of the Levo molecule ($C_{18}H_{20}FN_3O_4$).

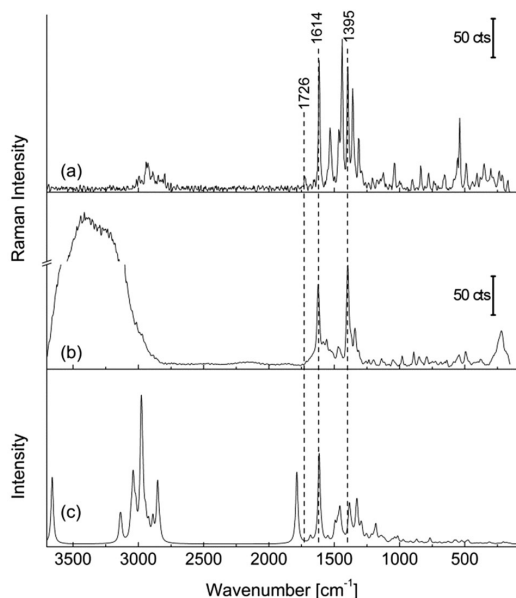


Fig. 2 Recorded Raman spectrum of (a) Levo powder and (b) saturated aqueous solution. (c) Calculated Raman spectrum obtained using B3LYP/6-31 G(d,p) method.

is difficult.²⁹ Nevertheless, the calculated Raman spectrum is in good accordance with the one presented by Gunesekaran *et al.*²⁹ Hence, the detailed vibrational assignment is not the subject of this publication.

By comparing Fig. 2(a) with (b) one may see that the signal of the molecules in an aqueous environment strongly differs from the one of the powder. This can be explained by considering that in the case of the solid state molecules form crystals. Singh *et al.*³⁵ performed the conformational analysis of the Levo molecule and they also predicted the crystal structure of the hydrated and anhydrous forms. According to their results, the molecular packing is obtained through strong $\pi \cdots \pi$ interactions and bridges formed *via* the $O-H \cdots N$ (*N*-methylpiperazine ring) and $O-H \cdots O$ (carboxylate group) hydrogen bonds.

Once Levo is solved in water the close packing might be destroyed inducing a change in the polarization and, hence, in the Raman spectrum. The Raman modes with the highest intensities present in the case of the saturated aqueous solution are centred at 1614 cm^{-1} and 1395 cm^{-1} . The first one is ascribed to the $C=C$ vibration of the quinolone ring system while the second one is due to the combined contribution of the vibration of the same aromatic moieties with the COO^- symmetric stretching. The presence of the carboxylate group is due to the zwitterion characteristic of the molecules. Thus, upon protonation, the carboxylic unit converts into a carboxylate group. Here, the two $C-O$ bonds have the same length with the negative charge centred equally on the two oxygen atoms rather than on the single bonded O. Hence, one may speak about the delocalization of electrons. This is also further supported by the very weak Raman mode at 1726 cm^{-1} assigned to the $\nu(C=O)$ vibration of the carboxylic group measured on powder. Nevertheless, the same band is completely absent in the aqueous solution as zwitterions are more stable as the uncharged Levo molecules.³⁴

Generally, regardless of the preparation protocol, different salts are added to the Ag colloids in order to overcome the electrostatic repulsion between the particles.^{31,36,37} As a result, a considerable enhancement of the SERS signal of the target molecules is achieved. However, in the case of the Levo molecules the addition of potassium chloride induces the reverse effect. SERS spectra of different mixtures have been recorded and are presented in Fig. 3. As reference, the blank spectra of Ag colloids with and without salt addition are also plotted. The presence of KCl in a final concentration of 0.9 mM results in the increase in the intensity of the band located around 238 cm^{-1} due to the absorption of Cl^- ions on the surface of the nanoparticles. Apart from this, only bands assigned to the vibrations of the water molecules are present. Hence, no interferences of the background are expected when the SERS spectrum of the analyte is acquired.

The influence of the salt addition on the SERS spectrum of the analyte is significant as it can be observed by comparing the spectra in Fig. 3(c–e). The highest intensities were recorded when no electrolyte is added to the mixture. This may indicate that a so called “analyte induced aggregation” of the silver nanoparticles takes place. Nevertheless, the intensity strongly

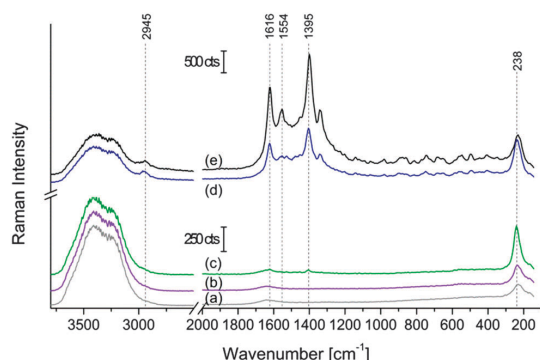


Fig. 3 SERS spectra of (a) Ag + H₂O, (b) Ag + H₂O + 1 M KCl, (c) Ag + 1 M KCl + Levo, (d) Ag + Levo + 1 M KCl, (e) Ag + Levo + H₂O mixtures. The ratio of Ag colloids to Levo or H₂O was 1:1. The final concentrations of Levo and KCl in the mixture was 4.5×10^{-5} M and 0.9 mM, respectively.

dropped when KCl was present in the solution. In both cases, the Levo molecules are allowed to interact with the Ag colloids, the 1 M KCl being pipetted in the cuvette as last. Furthermore, when the salt is added first and only afterwards the analyte, the signal is almost completely disappearing. This phenomenon may be attributed to the strong affinity of the negatively charged chloride ions for the silver nanoparticles.^{30,38,39} Consequently, a competition at the metallic surface takes place between the Levo molecules and the Cl⁻. This is particularly proved by the importance of the order in which the target analyte and potassium chloride is added to the Ag nanoparticles.

The presented hypothesis is further supported by the recorded UV-Vis spectra. For reference, in Fig. 4 the extinction spectrum of the Ag colloid mixed with purified water in a ratio of 1:1 is presented. The absorption band centred at 407 nm is in good accordance with the already published results³¹ proving that the synthesis was carried out with success. When Levo with a concentration of 0.5 mM is added to the Ag nanoparticles the colour of the colloid turns from yellow to grey. This is a clear indication for the induction of silver nanoparticle aggregates. Furthermore, in the recorded UV-Vis

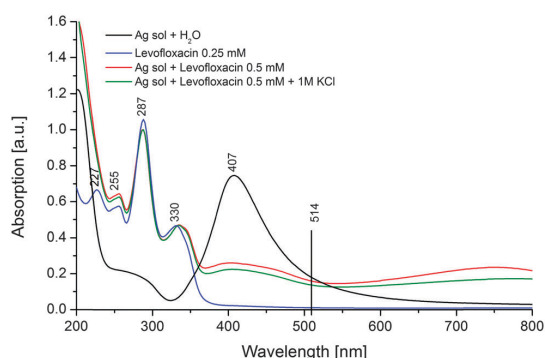


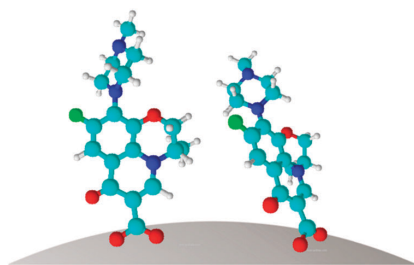
Fig. 4 UV-Vis spectra of different solutions.

spectrum of the mixture one may see that the absorption band at 407 nm considerably decreases in intensity. Additionally, a second broad band centred at 750 nm appears in the high wavelength region due to the presence of silver clusters. Beside these, strong absorption bands located in the 200–350 nm region and assigned to the strong $\pi-\pi^*$ molecular transitions of the Levo molecule²⁹ were detected. The absorption spectrum of the pure analyte is plotted for reference with blue line in Fig. 4. By further adding 1 M KCl solution to the Ag colloid:Levo mixture the intensity of the 407 nm absorption band and the one at 750 nm decreases further. This may indicate the creation of larger polydispersed Ag clusters which are no longer able to support plasmonic resonances, leading to the decrease of the SERS signal.

Furthermore, it is well known, that in order to obtain SERS spectra of the target analyte the molecules have to adsorb efficiently to the SERS substrate.⁴⁰ This occurs either *via* van der Waals forces or forces which involve valence bindings. In the first case no relevant differences are expected between the normal Raman and the SERS spectra. In the second case, the band intensities and positions can be affected due to the formation of metal-molecule complex. By closely comparing the normal Raman and SERS spectra (see Fig. 2 and 3) no significant band shifts are noticed. However, the ratio of the two most intense Raman modes at 1395 and 1614 cm⁻¹ is changing in the following way: for powder $I_{1395/1614} = 0.98$, for aqueous solution the ratio is 1.31, in the presence of silver nanoparticles it amounts to 1.33 while after KCl addition it increases to 1.47. The difference in the band ratio for the Raman spectra of powder and saturated aqueous solution arises due to the fact that the zwitterion is slightly more stable in aqueous environment than the uncharged form of the Levo.³⁴ As a result, the number of molecules with deprotonated carboxylic group increased. This leads to the disappearance of the 1726 cm⁻¹ band ascribed to the C=O stretching and an increase in intensity of the 1395 cm⁻¹ Raman mode. In the case of the SERS spectra, the change in band ratios was generally attributed to a change in the orientation of the target molecule. The two particular Raman modes have been ascribed to the stretching of the quinolone ring system with the difference that in the case of the 1395 cm⁻¹ band the $\nu_s(\text{COO}^-)$ also has a contribution. This might suggest that the Levo interacts with the surface of the Ag nanoparticles through the COO⁻ group. Furthermore, the adsorption should happen *via* the lone pair electrons of the oxygen atom rather than through the delocalized electrons of the carboxylate group. The latter possibility is ruled out considering that the position of the band doesn't change as compared to the normal Raman spectrum.⁴¹ In the literature shifts as high as 13–19 cm⁻¹ have been observed when molecules containing carboxylate groups interact with the metallic surface *via* the delocalized electrons.^{42,43} Beside these considerations, the downshift by 10 cm⁻¹ of the Raman mode at 238 cm⁻¹ due to the $\nu(\text{Ag-Cl})$ present in the SERS spectra when KCl is added might indicate the formation of Ag-O bonds instead of Ag-Cl.

Moreover, by taking into consideration the surface selection rules⁴⁴ one may deduce the orientation of a molecule containing

PCCP



Scheme 2 Sketch of the orientation of the Levo molecule on the surface of the Ag nanoparticles.

aromatic moieties based on whether the in-plane or out-of-plane ring vibrations are predominantly enhanced. More exactly, when the Raman modes assigned to the in-plane ring vibrations are enhanced an upright orientation is assumed, while in the case of the enhanced out-of-plane vibrations the molecule adopts a parallel orientation on the surface of the metallic nanoparticles. In the case of the SERS spectrum measured in the absence of KCl one may notice the presence of the Raman band centred at 1554 cm^{-1} . This was assigned to the in-plane mode of the quinolone ring system.³⁴ Furthermore, no out-of-plane vibrations are detected in the $900\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ region. As a result, it is assumed that the Levo molecules adopt an upright orientation with the aromatic ring system being perpendicular or slightly tilted on the Ag surface (see Scheme 2). When Cl^- ions are added to the solution, the 1554 cm^{-1} Raman mode loses intensity while no other new bands appear in the SERS spectrum as compared with the “no KCl” case. This might indicate that the target analyte is slightly tilted on the SERS substrate. This orientation is further supported by considering the Raman mode ascribed to the C–H stretching vibrations in the high wavenumber region (2945 cm^{-1}). It is well known, that these vibrations are more enhanced when the bond is perpendicular than when it lies parallel to the surface of the metallic nanoparticle.

LOC-SERS measurements

Due to the clinical and environmental relevance of Levo its detection in concentrations ranging between 1 mM to $1\text{ }\mu\text{M}$ or below is of major importance. Here, the first determination by means of LOC-SERS in the $1\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ range is presented. In order to provide reproducible measurement conditions and a high precision for serial dilutions a droplet based microfluidic setup has been used. According to the picture presented in Fig. 1, aqueous solutions of Levo with a starting concentration of 10^{-5} and 10^{-4} M were mixed in the chip with purified water in order to obtain 15 different concentration steps. The time elapsed between the addition of the Ag colloids to the analyte containing droplet and measurement was 3 minutes. In Fig. 5 the mean SERS spectra of all concentration steps were plotted together with the blank spectrum. For the later one only purified water was pumped at the first dosing unit. When compared with this, the two Raman modes characteristic to Levo at 1395 and 1614 cm^{-1} are visible starting with a concentration of $1.42\text{ }\mu\text{M}$. For a better visualization the band due to the quinolone ring

View Article Online

Paper

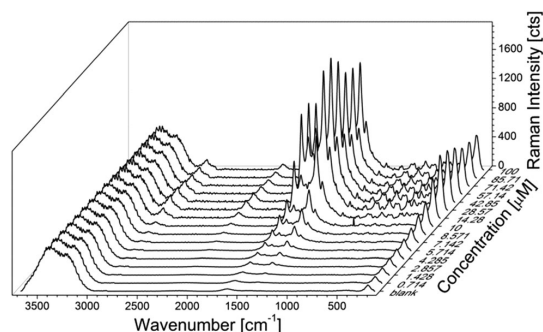


Fig. 5 Mean SERS spectra of Levo with concentrations between 0.714 and $100\text{ }\mu\text{M}$ measured in the microfluidic platform. The mean spectrum of the blank (when only H_2O is pumped through at the first dosing unit) is also shown.

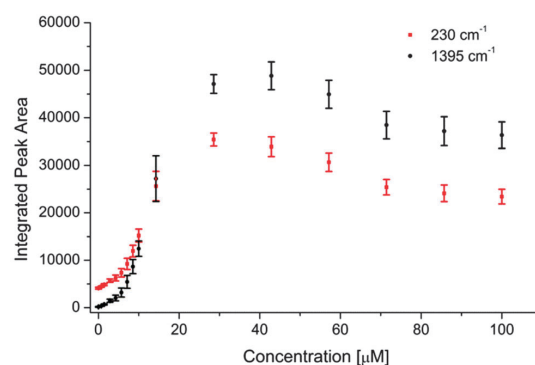


Fig. 6 Concentration dependency of the integrated peak area for the Raman mode @ 1395 cm^{-1} due to the ring vibration of the quinolone system and $\nu(\text{COO}^-)$ and the @ 230 cm^{-1} due to the Ag–O stretching.

stretching combined with $\nu_s(\text{COO}^-)$ mode was chosen. The peak area was calculated according to Simpson's rule and the mean value and its standard deviation were plotted against the in-droplet concentration of the target analyte (see Fig. 6, black scatter plot). The calculation was performed for every single spectrum of a given concentration step.

For the low concentrations an exponential increase is observed, while for concentrations higher than $20\text{ }\mu\text{M}$ a plateau region was obtained. The latter phenomenon may be explained by considering the limited free binding sites at the Ag nanoparticles' surface. Once the amount of the Levo molecules reaches a critical threshold a further addition will not lead to the increase of the signal. Furthermore, the SERS effect has a short range, the high electromagnetic field resulting from the excitation of plasmon resonances decays strongly with the distance. Therefore, only the molecules located in the first several layers on the metallic nanoparticles provide enhanced Raman signals.

Based on the fundamental characterization of the Levo molecule it was concluded that a so called analyte induced aggregation of the Ag nanoparticles takes place. Considering that no other molecules were present in the microdroplets,

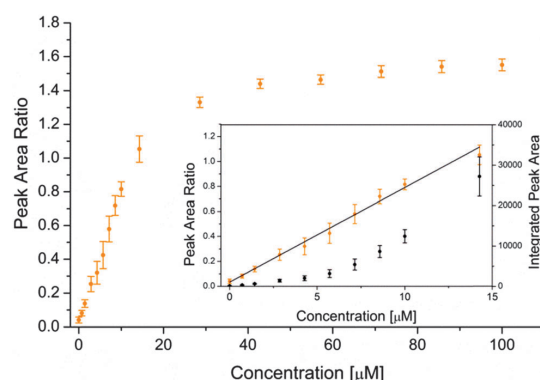


Fig. 7 The peak area ratio of the 1395 cm^{-1} and 230 cm^{-1} Raman modes against the in-droplet concentration of Levo. In the inset, the comparison of the integrated peak area of the Raman mode at 1395 cm^{-1} vs. the normalized peak area is shown for the 0–15 μM concentration range.

the intensity increase of the Raman mode centred at 230 cm^{-1} and assigned to the $\nu(\text{Ag-O})$ is due to the increase of the number of adsorbed Levo molecules. Concerning the response of the peak area at the increase of the concentration a slightly different behaviour, as compared with the 1395 cm^{-1} band, is observed (Fig. 6, red scatter plot). More exactly, for concentrations below 14 μM the increment for the $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu_s(\text{COO}^-)$ band is more pronounced. At 14 μM the two values are similar, while above this point both reach saturation. However, the peak area of the 230 cm^{-1} is smaller as compared with the other Raman mode. Therefore, the underlying mechanism behind the increment of the signal has to be different for the two Raman bands. On one hand, the Raman mode at 230 cm^{-1} band is due to the Levo molecules in the first layer on the surface of the metallic nanoparticles. On the second hand, the intensity of the 1395 cm^{-1} is increasing also due to the molecules present in the upper layers but still found in the hot-spot between the nanoparticles. Thus, for concentrations lower than 14 μM by calculating the peak area ratio of the two Raman modes a normalization of the SERS signal making use of the analyte induced aggregation can be carried out. In Fig. 7 it is shown that after the normalization a linear response with a correlation factor of 0.99 is achieved over the 0–15 μM concentration range (inset Fig. 7). Furthermore, in order to calculate the limit of detection (LOD) the so called “three times standard deviation of the blank” IUPAC criterion was used. The same integration borders applied for the calculation of the peak area of the Raman mode centred at 1395 cm^{-1} were used for calculating the area underneath the curve of the blank spectra.

Afterwards, the value of the three times the standard deviation of the blank was used as threshold for estimating the LOD. According to this, concentrations down to 0.8 μM can be detected by employing the LOC-SERS technique.

Conclusions

In the present study, the spectroscopic characterization of the Levo molecule and its detection in the 1–100 μM concentration

range in aqueous solution was carried out. It was shown that the aggregation of the silver nanoparticles is induced in the presence of the analyte and no additional salts are necessary in order to achieve high intensity SERS spectra. Furthermore, due to the competition at the surface of the Ag colloids between the Cl^- and the Levo molecules, the order in which these two chemicals are added to the silver sols has a high importance. Based on the surface selection rules, the change in the intensity ratio of selected Raman modes and the presence of the 230 cm^{-1} band ascribed to the $\nu(\text{Ag-O})$ vibration the orientation of the molecule at the silver surface was determined. Thus, in the absence of chloride ions Levo adopts a perpendicular or slightly tilted orientation, while in the presence of KCl it is titled. In both cases, the interaction of the analyte happens *via* the lone pair electrons of the oxygen atoms of the carboxylate group. In the second part of the paper it was shown that Levo can be detected in a concentration as low as 0.8 μM . Moreover, the linearity of the SERS signal vs. the in-droplet concentration of the analyte can be significantly improved by normalizing the signal to the Raman mode due to the Ag-O stretching vibration.

Acknowledgements

The funding of the PhD project of I. J. Hidi within the framework “Carl-Zeiss-Strukturmaßnahme” is gratefully acknowledged. The projects “QuantiSERS” (03IPT513A) and “Jenaer Biochip Initiative 2.0” (03IPT513Y) within the framework “InnoProfile Transfer – Unternehmen Region” are supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF). We thank the microfluidic group of the IPHT for providing the lab-on-a-chip devices for the measurements. Additionally, the help of Dr Dirk Bender with the theoretical calculations is gratefully acknowledged.

Notes and references

- 1 D. S. North, D. N. Fish and J. J. Redington, *Pharmacotherapy*, 1998, **18**, 915–935.
- 2 A. P. Cardile, H. Briggs, S. R. Burguete, M. Herrera, B. L. Wickes and J. H. Jorgensen, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2014, **78**, 199–200.
- 3 R. F. Grossman, P.-R. Hsueh, S. H. Gillespie and F. Blasi, *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, **18**, 14–21.
- 4 F. C. Adler-Shohet, J. Low, M. Carson, H. Girma and J. Singh, *Pediatr. Infect. Dis.*, 2014, **33**, 664–666.
- 5 G. Cao, J. Zhang, X. Wu, J. Yu, Y. Chen, X. Ye, D. Zhu, Y. Zhang, B. Guo and Y. Shi, *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2013, **38**, 394–400.
- 6 F. M. E. Wagenlehner, M. Kinzig-Schippers, F. Sörgel, W. Weidner and K. G. Naber, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2006, **28**, 551–559.
- 7 A. A. Salem, H. A. Mossa and B. N. Barsoum, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2005, **62**, 466–472.
- 8 M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero and S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 3975–3981.

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

View Article Online

PCCP

Paper

- 9 H. Sun, H. Wang and X. Ge, *J. Clin. Lab. Anal.*, 2012, **26**, 486–492.
- 10 E. M. Golet, I. Xifra, H. Siegrist, A. C. Alder and W. Giger, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, **37**, 3243–3249.
- 11 D. Fatta-Kassinos, S. Meric and A. Nikolaou, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 251–275.
- 12 I. Senta, S. Terzic and M. Ahel, *Water Res.*, 2013, **47**, 705–714.
- 13 R. Cazorla-Reyes, R. Romero-González, A. G. Frenich, M. A. Rodríguez Maresca and J. L. Martínez Vidal, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **89**, 203–212.
- 14 S. Siewert, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, **41**, 1360–1362.
- 15 R. Gao, N. Choi, S. I. Chang, S. H. Kang, J. M. Song, S. I. Cho, D. W. Lim and J. Choo, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **681**, 87–91.
- 16 M. Lee, K. Lee, K. H. Kim, K. W. Oh and J. Choo, *Lab Chip*, 2012, **12**, 3720–3727.
- 17 M. Wang, M. Benford, N. Jing, G. Coté and J. Kameoka, *Microfluid. Nanofluid.*, 2009, **6**, 411–417.
- 18 C. Rivet, H. Lee, A. Hirsch, S. Hamilton and H. Lu, *Chem. Eng. Sci.*, 2011, **66**, 1490–1507.
- 19 L. Wu, Z. Wang, S. Zong and Y. Cui, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **62**, 13–18.
- 20 P. C. Ashok, M. E. Giardini, K. Dholakia and W. Sibbett, *J. Biophotonics*, 2014, **7**, 103–109.
- 21 K. M. Marzec, T. P. Wrobel, A. Rygula, E. Maslak, A. Jasztal, A. Fedorowicz, S. Chlopicki and M. Baranska, *J. Biophotonics*, 2014, **7**, 744–756.
- 22 J. Yang, L. Zhen, F. Ren, J. Campbell, G. L. Rorrer and A. X. Wang, *J. Biophotonics*, 2014, **9999**, DOI: 10.1002/jbio.201400070.
- 23 D. Cialla, A. Marz, R. Bohme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 27–54.
- 24 P. Negri and R. A. Dluhy, *J. Biophotonics*, 2013, **6**, 20–35.
- 25 A. März, K. R. Ackermann, D. Malsch, T. Bocklitz, T. Henkel and J. Popp, *J. Biophotonics*, 2009, **2**, 232–242.
- 26 E. Kammer, K. Olschewski, T. Bocklitz, P. Rosch, K. Weber, D. Cialla and J. Popp, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 9056–9063.
- 27 U. Neugebauer, A. Szeghalmi, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp and U. Holzgrabe, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2005, **61**, 1505–1517.
- 28 Y. Wang, K. Yu and S. Wang, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2006, **65**, 159–163.
- 29 S. Gunasekaran, K. Rajalakshmi and S. Kumaresan, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2013, **112**, 351–363.
- 30 S. Lecomte, N. J. Moreau, M. Manfait, J. Aubard and M. H. Baron, *Biospectroscopy*, 1995, **1**, 423–436.
- 31 N. Leopold and B. Lendl, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 5723–5727.
- 32 A. Frisch, A. Nielsen and A. Holder, *Gaussian Inc.*, Pittsburgh, PA, 2000.
- 33 I. Sousa, V. Claro, J. L. Pereira, A. L. Amaral, L. Cunha-Silva, B. de Castro, M. J. Feio, E. Pereira and P. Gameiro, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **110**, 64–71.
- 34 A. Lambert, J.-B. Regnouf-de-Vains and M. F. Ruiz-López, *Chem. Phys. Lett.*, 2007, **442**, 281–284.
- 35 S. S. Singh and T. S. Thakur, *CrystEngComm*, 2014, **16**, 4215–4230.
- 36 A. M. El Badawy, K. G. Scheckel, M. Suidan and T. Tolaymat, *Sci. Total Environ.*, 2012, **429**, 325–331.
- 37 I. J. Hidi, A. Muhlig, M. Jahn, F. Liebold, D. Cialla, K. Weber and J. Popp, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 3943–3947.
- 38 J. Aubard, E. Bagnasco, J. Pantigny, M. F. Ruasse, G. Levi and E. Wentrup-Byrne, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 7075–7081.
- 39 G. Lévi, J. Pantigny, J. P. Marsault and J. Aubard, *J. Raman Spectrosc.*, 1993, **24**, 745–752.
- 40 E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin, in *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, ed. E. C. L. Ru and P. G. Etchegoin, Elsevier, Amsterdam, 2009, pp. 367–413, DOI: 10.1016/B978-0-444-52779-0.00013-1.
- 41 Y. J. Kwon, D. H. Son, S. J. Ahn, M. S. Kim and K. Kim, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 8481–8487.
- 42 H. Park, S. B. Lee, K. Kim and M. S. Kim, *J. Phys. Chem.*, 1990, **94**, 7576–7580.
- 43 Y. J. Kwon, S. B. Lee, K. Kim and M. S. Kim, *J. Mol. Struct.*, 1994, **318**, 25–35.
- 44 M. Moskovits and J. S. Suh, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 5526–5530.

1.5. Toward Levofloxacin Monitoring in Human Urine Samples by Employing the LoC-SERS Technique [IH3]

Izabella J. Hidi, Martin Jahn, Mathias W. Pletz, Karina Weber, Dana Cialla-May
und Jürgen Popp

J. Phys. Chem. C, 2016, 120, 20613 – 20623

Reprinted with kind permission from the American Chemical Society,
Copyright © 2016.

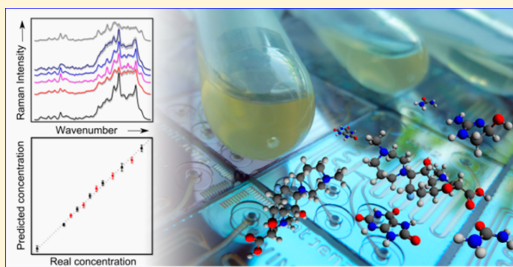
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jpcc.6b01005>

Toward Levofloxacin Monitoring in Human Urine Samples by Employing the LoC-SERS Technique

Izabella J. Hidi,^{†,‡} Martin Jahn,^{†,‡} Mathias W. Pletz,^{§,||} Karina Weber,^{†,‡} Dana Cialla-May,^{*,†,‡} and Jürgen Popp^{*,†,‡}[†]Friedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07745 Jena, Germany[‡]Leibniz Institute of Photonic Technology Jena, Albert-Einstein-Strasse 9, 07745 Jena, Germany[§]Center for Infectious Diseases and Infection Control, Jena University Hospital, Erlanger Allee 101 07740 Jena, Germany^{||}InfectoGnostics Research Campus Jena, Center for Applied Research, Philosophenweg 7, Jena, 07743, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: The pharmacokinetics of antibiotics such as levofloxacin exhibits large interindividual differences, questioning the value of fixed dose regimens and warranting individual dosing based on therapeutic drug monitoring. Here, in a proof of principal study, it is shown that levofloxacin can be detected in human urine samples by employing lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LoC-SERS). First, artificial urine is used as a matrix in order to get insights into the influence of different parameters such as matrix complexity, aggregation time, and matrix dilution on the overall SERS signal. Second, three anonymized individual and three pooled urine samples originating from patients undergoing either no or unknown medical treatments have been spiked with the target analyte. Measurements were performed with a benchtop and a portable Raman setup. In all six samples urinary levofloxacin concentrations between 0.45 mM (162.6 $\mu\text{g/mL}$) and 1.8 mM (650.5 $\mu\text{g/mL}$) have been successfully detected. According to the literature, the normal levofloxacin concentration in urine is 1.38 mM \pm 0.68 mM with a minimum measured concentration of 0.45 mM after 4 h from the administration of a 500 mg dose. The presented results therefore show that LoC-SERS is a promising bioanalytical tool for urine analysis.



INTRODUCTION

The effective treatment of bacterial infections is a major issue due to the occurrence of antibiotic resistances. Depending on the risks associated with a given medical treatment, clinical trials may include healthy and/or patient volunteers in order to establish the pharmacokinetic and pharmacodynamic (PK-PD) parameters of drugs. In the case of antibiotics used for treating infections, most often healthy volunteers are recruited for dose finding studies. There is a growing body of literature demonstrating that fixed dose regimens derived from such studies fail in the critically ill intensive care unit (ICU) patient. Due to the high variability of PK parameters—within the same patient on different days—experts demand therapeutic drug monitoring for antibiotics in ICU patients.¹ Therapeutic drug monitoring (TDM) was introduced at the beginning of the '70s, initially to avoid overdosing and toxicity of antibiotics with a small therapeutic window, such as aminoglycosides and vancomycin.

Levofloxacin is a second generation fluoroquinolone widely used for the treatment of bacterial infections, particularly respiratory and urinary tract infections.^{2,3} It is generally well tolerated by patients; however, several reports have been

published concerning its adverse effects, such as, for example, tenosynovitis,⁴ crystal nephropathy,⁵ hepatotoxicity,⁶ pharmacokinetic interaction,^{7,8} Achilles rupture,⁹ and metabolic coma.¹⁰ Additionally, in the case of obese patients¹¹ even if the maximum concentration of the drug appeared to be similar to the case of normal-weight individuals, a significantly faster clearance rate was observed. As a consequence, the total drug exposure over time was altered and the efficiency of the treatment was decreased. Levofloxacin undergoes limited metabolism in the human body, more than 85% of the administered dose being excreted in urine as unchanged drug. Therefore, its clearance rate can be easily monitored by determining its concentration in urine. Based on the pharmacokinetic studies carried out with healthy volunteers and published by Wagenlehner et al.,^{2,12,13} urinary concentrations of levofloxacin after 4 h from the administration of a

Special Issue: Richard P. Van Duyne Festschrift

Received: January 29, 2016

Revised: March 14, 2016

Published: March 16, 2016



ACS Publications

© 2016 American Chemical Society

20613

DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01005
J. Phys. Chem. C 2016, 120, 20613–20623

single oral dose of 500 mg are $1.38 \text{ mM} \pm 0.68 \text{ mM}$ with a minimum measured concentration of 0.45 mM .

Chromatographic methods, based on the physical separation of mixtures due to the differences in the components' partition coefficient, are the gold standard for TDM.^{3,14–17} While chromatography is characterized by a high sensitivity and specificity, it is still limited by complex sample preparation steps needed in order to get a final extract fully compatible with chromatographic determination. During the last three years, the number of publications focusing on the detection of biological relevant molecules in artificial and human urine by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) has significantly increased. Results include the detection of free heme as biomarker for acute kidney dysfunction,¹⁸ and of hypoxanthine as biomarker for prostate cancer,^{19,20} acetyl amantadine,²¹ methamphetamine,^{22,23} creatinine,^{24–26} 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone,²⁷ adenosine,^{28,29} uric acid,²⁵ urea and promethazine,³⁰ glucose,^{31,32} fructose,³³ and nicotine.³⁴ A significant part of these studies employs functionalized planar SERS substrates known for low spot-to-spot and substrate-to-substrate reproducibility. A small fraction uses cuvette based SERS measurements with colloidal Ag or Au nanoparticles (NPs). Nevertheless, both approaches are limited by the lack of reproducible and automatic measurement conditions. One of the solutions for these shortcomings is the so-called lab-on-a-chip SERS (LoC-SERS) technique. Here, the high specificity offered by Raman spectroscopy^{35,36} is combined with the sensitivity of SERS^{37,38} and high sample throughput of droplet based microfluidic platforms while the measurements are automated and fast.^{39,40} Furthermore, easy to prepare colloidal solutions, such as the ones synthesized according to the Leopold-Lendl protocol,⁴¹ can be employed.

In a previous publication of ours,³⁹ we could show that SERS combined with droplet based microfluidics is suitable for the detection of levofloxacin in purified aqueous solution. A linear response was achieved for a concentration range of $0.8\text{--}15 \text{ }\mu\text{M}$ by using the Raman mode assigned to the Ag–O stretching vibration as an internal standard. Additionally, it was found that the analyte is inducing the aggregation of the Ag nanoparticles (Ag NPs) used as SERS substrates. Thus, no further addition of chemicals is necessary to achieve an optimal SERS enhancement. Finally, insights regarding the adsorption mechanism of the molecule on the surface of the metallic nanoparticles were also presented. As a continuation, the work presented here focuses on the determination of levofloxacin in artificial and human urine. First, an artificial urine matrix was used in order to have an easy to access and easy to handle solution mimicking human urine samples. The results obtained for artificial urine are the basis for the detection of levofloxacin in human urine samples. The final aim was to prove that LoC-SERS can be applied for levofloxacin clearance monitoring and for assessing patient compliance. Therefore, the investigated urinary concentration range was chosen to be between 0.45 and 1.8 mM (see above). To the best of our knowledge, this is the first report proving the high potential of SERS for the determination of levofloxacin in human urine samples. Furthermore, in order to demonstrate the potential of LoC-SERS as a fast bed-side analysis approach, a miniaturized Raman setup has been also applied.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents. Levofloxacin (HPLC, 98%), silver nitrate (ACS reagent, 99%), hydroxylamine hydro-

chloride (ReagentPlus, 99%), sodium hydroxide, and creatinine (anhydrous, $\geq 98\%$) have been purchased from Sigma-Aldrich. CaCl_2 ($\geq 94\%$), Na_2SO_4 ($\geq 99\%$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$, p.a., ACS), KCl ($\geq 99.5\%$ p.a. ACS, ISO), urea ($\geq 99.5\%$, p.a.), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98\%$, Ph.Eur., USP), Na_2HPO_4 ($\geq 99\%$, p.a., ACS), sodium citrate ($\geq 99\%$, extra pure), and NaCl ($\geq 99.5\%$ p.a. ACS, ISO) were bought from Carl Roth while NH_4Cl (EMSURE ACS, ISO, Reag. Ph Eur) was received from Merck. All chemicals have been used as received without further purification.

Sample preparation. The silver colloidal solution was prepared according to the protocol published by Leopold and Lendl.⁴¹ Silver nitrate was added to a mixture of hydroxylamine hydrochloride and sodium hydroxide under vigorous stirring. The final concentrations of the chemicals in the solution are 10^{-3} M for silver nitrate, $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ for hydroxylamine hydrochloride, and $0.3 \times 10^{-3} \text{ M}$ for sodium hydroxide. The color of the solution turned instantaneously into gray-yellow. Stirring was continued for 10 s. The as-prepared solution was stored at 4°C until the measurements were performed. The same batch was used for both artificial and human urine measurements. Figure S1 (in SI) presents the UV–vis spectra of the pure colloids and of the aggregated Ag NPs due to the addition of KCl. Computer simulations have shown that strong signal enhancements cannot be obtained using a pure colloidal suspension where mainly only monomer metallic nanoparticles are present.²³ Therefore, choosing a laser line for excitation at 407 nm will not provide the highest SERS enhancement. Instead, 532 nm was employed in order to excite the coupled plasmonic resonances located in the “hot spots” between aggregated nanoparticles. Finally, for comparison, a second fresh batch was also prepared.

Artificial urine was synthesized according to a modified protocol published by Yang et al.⁴² Briefly, the aqueous solution contains 13.72 mM CaCl_2 , 34.21 mM Na_2SO_4 , 5.92 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 85.99 mM NH_4Cl , 162.71 mM KCl, 832.5 mM urea, 19.44 mM creatinine, 17.05 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7.25 mM Na_2HPO_4 , 5.46 mM sodium citrate and 23.69 mM NaCl with a pH value of 5. Two stock solutions having a concentration of 1 mM levofloxacin were prepared by solving the appropriate amounts of powder in high purity water or in artificial urine. For the LoC-SERS studies the stock solutions were diluted with the corresponding solvents in order to reach the desired levofloxacin concentrations.

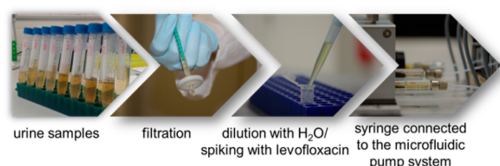
Nine anonymized human urine samples were received from the Institute of Medical Microbiology, University Hospital Jena. Analysis of human samples was approved by the local Ethical Committee (3701-02/13). Informed consent form was waived because these samples were left over volumes of routine analysis and were anonymized. The samples were kept at 4°C until filtration was carried out for sterilization and for removing cells and debris using a sterile syringe filter (Rotilabo-syringe filter, PVDF, sterile, pore size $0.22 \text{ }\mu\text{m}$). After filtration the samples were stored for one month at -21°C . On the evening prior the measurement day the vials were moved to 4°C and left to thaw overnight. A second filtration step was carried out in order to remove precipitated crystallized salts.⁴³ In the case of the measurements carried out with the portable Raman setup the urine sample was frozen again and kept at -21°C for two additional months.

For all samples, a test for the presence of antibiotics (“inhibitory test”), part of the microbiological routine analysis, was performed by the Institute of Medical Microbiology. Here

Bacillus subtilis was used on an agar diffusion assay. For six samples there was no visible inhibition of the bacteria growth, while for the other three the test was positive. For the latter case, patients have undergone medical treatments which caused the antibacterial activity. However, no information concerning the received medication is known, due to the anonymized nature of the samples.

LoC-SERS measurements were carried out on three individual (S1, S2, and S3) and three pooled samples (P0, P1, P2). S1, S2, and S3 had a negative inhibitory test result and they were further used for preparing pool P0. The three urine samples showing antibacterial activity were used for the second pool, P1. Last, further three negative samples build pool P2. The ratio of the amount of urine to water or/and aqueous levofloxacin solution used for spiking was chosen to be 3 to 11. Therefore, the urine samples were diluted to 21.4% prior to the measurements (Scheme 1). In total 12 solutions with different levofloxacin concentrations have been prepared for each sample/pool (see Supporting Information (SI), Table S1).

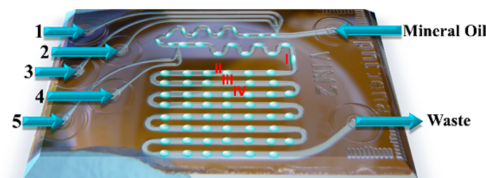
Scheme 1. Urine Sample Handling Steps



Instrumentation. The pH value of the samples was measured with a pH meter from Hanna Instruments (HI 9321) equipped with a combination microelectrode (HI 1083B).

For the LoC-SERS experiments two Raman setups have been employed. First, six measurement sets (SI, Table S2) have been performed with an XploRA INV inverted Raman microscope from Horiba Scientific. This Raman setup was equipped with a laser emitting at 532 nm with 5 mW power at the sample surface and a thermoelectrically cooled CCD camera ($-69\text{ }^{\circ}\text{C}$). During the measurements, the same objective (Nikon 20x 0.4 N.A.) was used for focusing the laser beam on the sample's surface and for collecting the backscattered photons. The Raman spectra were recorded with a spectral resolution of 8 cm^{-1} by employing a 600 l/mm grating, a pinhole of $100\text{ }\mu\text{m}$ and slit of $200\text{ }\mu\text{m}$. Second, in order to prove that LoC-SERS can be performed with a compact and cost-efficient Raman approach, a portable Raman setup (high resolution i-Raman© from B&WTEK equipped with a laser emitting at 532 nm, 12 mW power at the sample surface and a thermoelectrically cooled CCD ($+10\text{ }^{\circ}\text{C}$)) has been also employed. The same objective (Polytec, 20x, N.A. 0.4) was employed for focusing the laser beam and for collecting the backscattered light. The spectral resolution was $\sim 4\text{ cm}^{-1}$. For both Raman setups, an integration time of 1s was chosen while the position of the focus on the microfluidic chip was constant during measurements. Each mean SERS spectrum is a result of 600 individual acquisitions. Automatic and reproducible measurement conditions were achieved by mounting the glass chip (Scheme 2) directly on the microscope stage. A segmented flow is created by using mineral oil as a carrier fluid and aqueous solutions for all other reagents. Six different ports allow the injection of solutions via a computer controlled pump system (neMESYS

Scheme 2. Droplet Based Microfluidic Chip^a



^aPorts 1–5 are used for pumping various aqueous solutions. The numbers I–IV indicate the four different focus positions used during measurements.

Cetoni GmbH). A comprehensive description of the microfluidic platform can be found elsewhere.^{39,44}

Data processing. The raw data obtained by the LoC-SERS measurements were preprocessed and analyzed by the help of the statistical programming language R.⁴⁵ During spectra acquisition, alternating SERS/Raman spectra of analyte containing droplets, spectra of the oil phase or spectra with contribution from both phases are recorded. Therefore, the first data processing step consisted in removing the oil and mixed spectra. This was done by manually setting a threshold value for the intensity of the prominent oil marker band at around 2880 cm^{-1} . Afterward, stacks of three spectra recorded within one droplet were averaged, background corrected and cut to the wavenumber region of interest. For background correction the selective nonlinear iterative peak clipping (SNIP) algorithm was applied.⁴⁶ For the artificial urine samples the iteration number was set to 16 when the peak area of a characteristic Raman mode is calculated and 60 for the plots presenting the mean SERS spectra and their double standard deviation. For data visualization, a numerical integration of a Raman marker mode was performed and its value was plotted as a function of different parameters. As integration method Simpson's rule was chosen. For evaluating the robustness of the LoC-SERS technique three different data sets have been recorded and a multivariate statistical analysis was performed. For this, principal component analysis (PCA) combined with partial least-squares regression (PLSR)⁴⁷ was chosen. A more detailed discussion of this method can be found elsewhere.⁴⁸ Briefly, a PCA is performed in order to reduce the dimensionality of the data set and, therewith, to reduce the computational costs significantly. For training the PLS model only the first four PCA scores were applied, whereby four PLS latent variables were constructed. To evaluate the quality of the created PLS model a ten times averaged 10-fold cross validation was performed. Therefore, the training data set was split into ten parts, the so-called folds, of which in every of the ten cross-validation steps one was excluded from the training process and used for prediction. Afterward, the root-mean-square error of prediction for cross validation (RMSEPCV) was calculated as the averaged RMSEP of the ten validation steps. For the prediction, either on the training data set or onto unknown data, all four PLS latent variables were used.

In the case of the human urine samples 60 iterations were used for the SNIP algorithm, while the spectra were cut to the wavenumber range $300\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. The Raman mode centered at 637 cm^{-1} originating from uric acid is visible in all spectra and was used as an internal standard. Hence, prior to further evaluation, the SERS signals were normalized to the

sum of the intensity values in the spectral range between 592 and 682 cm^{-1} . Due to the strong convolution of the levofloxacin marker bands with the background signal of the matrix, the above-described PCA–PLSR multivariate statistical model was chosen for data evaluation instead of peak integration. The data were split into training and “unknown” data set. Furthermore, a ten times averaged 10-fold cross-validation was carried out for the training data set. Therefore, the training data set is split into ten parts of which in every cross-validation step one is excluded in the training process and used for the prediction. For every step the RMSEP is calculated and the average value of all ten steps is used as the final RMSEP of the cross-validation.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The chemical composition of human urine is very complex as the kidneys extract all soluble wastes from the bloodstream including excess water, sugars, proteins and many other components.⁴⁹ The resulting liquid has high concentrations of urea, uric acid, creatinine, inorganic ions i.e. chloride, sodium and potassium and pigmented products such as urobilin. Artificial urine was chosen as a matrix for levofloxacin detection in order to obtain an easy to access and easy to handle solution mimicking patient samples. The results obtained with the artificial urine as matrix were further applied to the detection of the target molecule in human urine samples.

Artificial urine. Figure 1 compares the mean SERS spectra of pure water, of the artificial urine, and of a 1 mM solution of

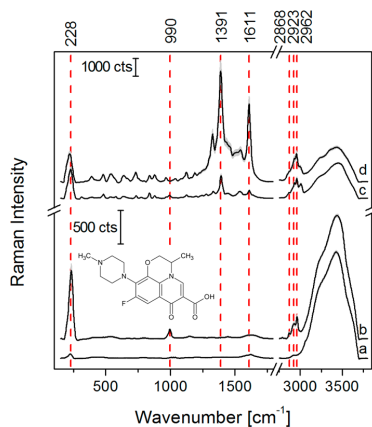


Figure 1. Mean SERS spectra and their double standard deviation for solutions containing Ag NPs and (a) H_2O , (b) artificial urine, (c) levofloxacin 1 mM in artificial urine, and (d) levofloxacin 1 mM in H_2O . Inset: chemical structure of levofloxacin.

levofloxacin in water and in artificial urine. In comparison to pure water, the Raman signal of artificial urine shows bands centered at 990 cm^{-1} , 2868 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , and 2962 cm^{-1} (Figure 1(a) and (b)). The mode at 990 cm^{-1} is due to the C–N stretching vibration of urea^{29,50} (SI, Figure S2), while the ones in the high wavenumber region are known to be due to C–H vibrations.⁵¹ Furthermore, by comparing the SERS signal of levofloxacin solved in purified water and in artificial urine, one may notice that the presence of the complex matrix does not induce any shifts in the wavenumber positions of the Raman marker modes characteristic for the investigated

antibiotic drug and located at 1391 and 1611 cm^{-1} . However, the matrix has an influence on the intensity of the Raman bands as well as on the band ratios.

The selective gain in intensity of the 1391 cm^{-1} Raman marker band of levofloxacin was previously attributed to a change in the orientation of the molecule on the surface of the Ag NPs.³⁹ The overall intensity of the SERS spectrum of levofloxacin solved in artificial urine might be affected by (1) competition between analyte and the complex matrix molecules at the surface of the Ag NPs and (2) creation of large Ag NP aggregates. In the first case, chloride ions or molecules like urea and creatinine can also adsorb on the surface of the NPs. As a consequence, the number of available free binding sites on the metallic surface for the target molecule to adsorb is reduced. In the second case, the presence of different salts can lead to Ag NP aggregates too large in order to still support optimal electromagnetic enhancement.³⁹

In order to prove the effect of the matrix components on the SERS signal of levofloxacin, the target molecule was solved in four aqueous solutions having different chemical compositions. The first solution 1, contained NH_4Cl , CaCl_2 , Na_2SO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 and $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$. Solution 2 contained additionally to the aforementioned salts also KCl and NaCl. For solution 3, urea was further added, while with the addition of creatinine, solution 4 is equal to the artificial urine itself. As reference, purified water was used as solvent (solution 0). The influence of the presence of the different molecules of the artificial urine on the integrated peak area of the levofloxacin Raman band at 1391 cm^{-1} is shown in Figure 2(A) (the recorded mean SERS spectra are presented in Figure S3(A)). Here, it is clearly shown that the presence of the various salts cause the strongest signal decrease, while the addition of urea and creatinine leads to further intensity losses. Even though the matrix has an increased complexity as compared to pure water, the Raman marker bands of levofloxacin can be clearly detected. For an improved signal-to-noise ratio for levofloxacin concentrations below 1 mM two parameters expected to alter the SERS enhancement have been further optimized, namely, the aggregation time of the Ag NPs and the dilution of the complex matrix were investigated.

First, the influence of the aggregation time was assessed by changing the focus position of the laser beam (see Scheme 2, positions I–IV). The first measurement position (I) is located after the second meander channel, and it is equivalent to 40 s elapsed, since the Ag NPs have been injected in the analyte containing droplets. The next ones were chosen in the middle of the first (II), second (III), and third (IV) channels corresponding to 60 s, 96 s, and 136 s, respectively. According to the results shown in Figure 2(B), with increasing aggregation time, the SERS intensity loss accompanied by the increase of the value of the relative standard deviation (RSD) of the peak area of the Raman mode at 1391 cm^{-1} is observed. Hence, aggregation time plays an important role and the ability of the LoC-SERS setup to keep it constant offers a great advantage over cuvette based SERS measurements.

As a second parameter, the influence of the dilution of the artificial urine with purified water was determined. Here, 0.5 mM levofloxacin/artificial urine was pumped through one of the ports while purified water through a second one. By varying the flow rates of the two syringes, seven different dilutions were achieved (Figure 2(C), mean SERS spectra in Figure S3(B)). In order to illustrate the changes induced in the SERS spectra, the Raman mode at 1391 cm^{-1} characteristic for levofloxacin (black

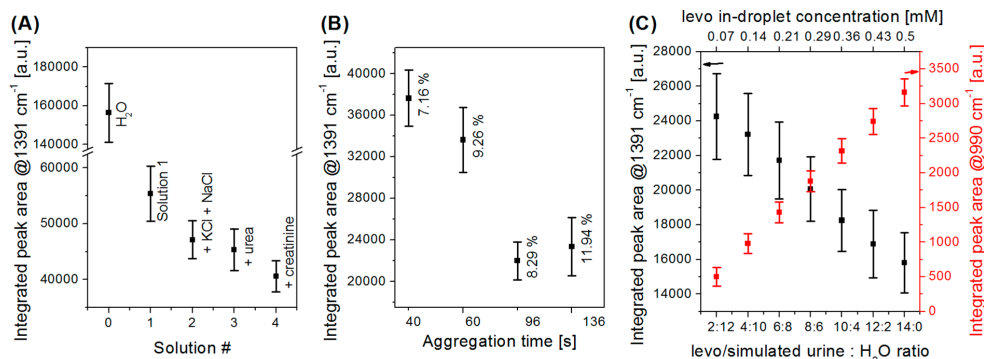


Figure 2. Influence of the (A) matrix components, (B) aggregation time, and (C) dilution with H₂O on the peak area of selected marker Raman modes of levofloxacin and urea, respectively. For (B) the labels represent the relative standard deviation of the peak area.

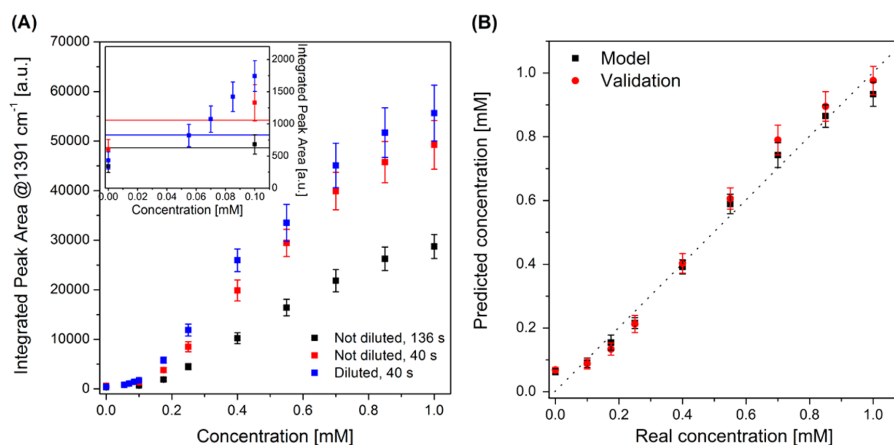


Figure 3. (A) Integrated peak area of the levofloxacin Raman mode at 1391 cm⁻¹ with measurements performed under three different conditions. In the inset, threshold lines representing the LOD values are represented. (B) PLSR prediction plot for three independent data sets measured under the condition: "not diluted, 40 s".

scatter) as well as the peak area of the band located at 990 cm⁻¹ and ascribed to the C–N vibration of the urea molecule (red scatter) is plotted. The upper *x* axis denotes the in-droplet concentration of levofloxacin while the lower *x* axis represents the ratio of artificial urine to H₂O. Here, the peak area of the two aforementioned Raman modes evolves dissimilar. In the case of urea, the intensity of its characteristic Raman band is increasing for increasing amounts of artificial urine. For levofloxacin, even though its in-droplet concentration, 0.07 mM, is almost 1 order of magnitude lower in the case of the 2:12 dilution ratio as compared to the nondiluted matrix, 0.5 mM, the signal is the most intense. Hence, one might use the dilution of the complex matrix with H₂O in order to reduce the matrix effects and optimize the SERS signal. However, one should be careful with the extent of dilution, as too strong dilution might lead to analyte concentrations below the detection limit and useful information concerning the spectral signature of the complex matrix can be also lost. Thus, for the following experiments a dilution ratio of 8:6 has been chosen.

In a next step, the influence of the aggregation time variation and dilution on the limit of detection (LOD) has been assessed.

LOD values were defined according to the IUPAC norms and are equal to the signal of the blank plus three times the standard deviation of the blank. Three different measurements were performed: (1) nondiluted matrix, 40 s aggregation time, (2) nondiluted matrix, 136 s aggregation time and (3) diluted matrix (ratio 8:6), 40 s aggregation time. In the first two cases 0.5 mM and 1 mM levofloxacin stem solutions were filled up in the syringes, while for the third one an additional syringe contained a solution with 0.1 mM levofloxacin. The peak area of the marker band at 1391 cm⁻¹ against the concentration of the analyte in artificial urine is plotted in Figure 3(A) (for the mean SERS spectra see Figure S4). Upon dilution, the LOD value was improved from 0.1 mM to 0.055 mM, while the aggregation time variation did not affect this parameter significantly. Even though the LOD value dropped from 0.8 μM³⁹ to 0.055 mM, when the target analyte was solved in artificial urine instead of purified water, in all three cases a good linearity was achieved for concentrations between 0.1 to 0.07 mM. This would suffice for the monitoring of levofloxacin clearance after 12 h from the administration of a single oral dose of 500 mg.²

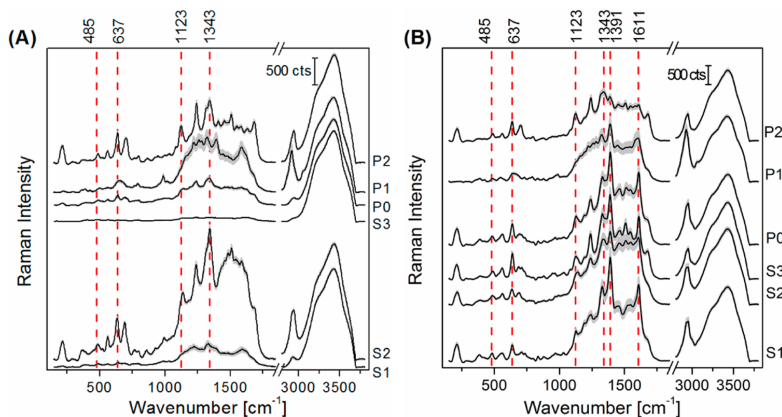


Figure 4. Mean SERS spectra and their double standard deviation of (A) the pure and (B) spiked ($c_{\text{urine}} = 1.8 \text{ mM}$) human urine samples.

Furthermore, the robustness of the LoC-SERS technique was tested using three independent data sets where the concentration dependent SERS signal of levofloxacin solved in nondiluted artificial urine (focus position I) has been recorded. Two sets were used for the construction of the PLS model (black scatter) while the third one was applied for validation (red scatter) (Figure 3(B)). The diagonal dotted line is shown just as a ledger line, and it does not represent an actual fit. The root-mean-square error of prediction for cross validation (RMSEPCV) for the model is 0.048 mM , while the RMSEP for validation is 0.058 mM . Both values are below the limit of detection (LOD). This proves that the LoC-SERS technique provides reproducible measurements, as data from different measurement days can be used for successfully predicting the concentration of a third sample.

In our previous study³⁹ it was shown that by using the Raman mode assigned to the Ag–O vibration as an internal standard the linear response of the SERS signal vs concentration can be significantly improved. The measurements have been carried out with purified water as a solvent. Hence, at the surface of the metallic NPs only levofloxacin molecules were adsorbed and the same molecules were inducing the aggregation of the NPs. In the case of artificial urine, various molecules are present which compete with the target analyte at the surface of the Ag NPs. The redshift of the Raman mode ascribed to the vibration of Ag (adsorbed ions) in artificial urine by 10 cm^{-1} as compared to a pure aqueous solution (see Figure 1(c) vs (d)) indicates the adsorption of other additional chemical species. Despite this competition, using the Raman mode at 228 cm^{-1} as an internal standard, once again as for the aqueous solutions, an improved linear response was obtained. Figure S5 highlights the concentration dependent peak area for the raw and normalized data. Upon normalization, the dynamic range is extended up to 1 mM while the goodness of fit is increased from 0.96 to 0.99 . A possible explanation might be that while the concentration of the molecules of the complex matrix is constant during the measurements, the concentration of the target molecule is increasing. Thus, the intensity of the Raman mode at 228 cm^{-1} is also increasing.

Overall, based on the results presented so far, it is expected that clinically relevant concentrations of levofloxacin can be detected in complex matrixes. However, as compared with an

“ideal” matrix where only water molecules might interfere with the Raman signal of the target molecules, the complexity of the artificial urine brings new challenges for the SERS technique. Namely, the presence of different ions, such as chloride, sulfate and phosphate reduce the available free binding sites on the metallic surface and can also induce aggregation. Therefore, when recording SERS spectra of human urine the different osmotic concentrations of the samples are expected to influence the detection of the target molecule. Furthermore, it was also shown that a short time elapsed since the mixing of the Ag NPs with the solution containing the target molecule is preferred. Thus, the RSD of the signal can be improved. Furthermore, by diluting the sample the LOD can be improved. By taking these into consideration, for the measurements carried out with human urine samples, which will be presented in the following section, the laser focus was fixed at position II and a dilution ratio of 3 parts human urine to 11 parts of pure water was used.

Human urine samples. The literature available regarding the SERS signal of human urine is continuously growing due to the availability of cost-effective portable Raman devices and due to no or minimal sample preparation requirements. However, urine spectra reported by different groups show high diversity,⁵² being strongly affected by the type of the SERS substrate employed and the applied Raman excitation wavelength. In order to bring SERS to the clinical routine one should take into account two parameters: (1) cost-effective and easy to prepare SERS active substrates, and (2) a low cost, compact and easy to handle Raman setup. For the work presented here, the protocol for the Ag NP synthesis was chosen by taking into account that they can be also prepared by nontrained personal and that no special equipment is required. Furthermore, for excitation 532 nm was selected due to the cost effectiveness of available diode lasers.

The LoC-SERS measurements with the chip presented in this study are performed by using the first three ports for the injection of the analyte containing solutions and the two last ports for pumping the colloids and their aggregation agent. For obtaining a stable signal it is very important that the dosing of the NPs into the analyte containing droplets takes place uniformly. However, due to the superficial tension between the Ag NPs containing solution and the urine sample this was not achieved and the SERS signals proved to be highly inhomogeneous leading to low reproducibility (results not

shown). Nevertheless, thanks to the flexibility offered by the various ports available on the microfluidic platform a new measurement layout could be used without compromising the automatic and reproducible measurement conditions. Here, the Ag NP solution and the one containing the urine sample to be measured are pumped into the main channel at the same time through port 1 and 3 and the mixing is achieved by the two meandering channels. Moreover, based on the results obtained with artificial urine as matrix, the laser was focused in the middle of the first channel (position II).

The recorded mean SERS spectra of the pure urine samples diluted with water are presented in Figure 4(A). The first observation is that the overall intensity of the signal is strongly varying in between the samples. This can be caused by the different pH values of the samples (Table 1) as well as by their

Table 1. pH Value of the Human Urine Sample

Sample	S1	S2	S3	P0	P1	P2
pH	5.76	7.19	5.80	6.16	5.35	7.00

different osmotic concentrations. The samples having an acidic pH (S1, S3, and P0) show a considerably weaker SERS signal when compared with the neutral ones (S2 and P2). The pool P1 with a pH of 5.35 originating from patients with positive inhibitory test results and with a pH of 5.35 has a background comparable in intensity with the neutral samples. Here, the higher concentration of the aggregation inducing chemical species could play a more important role than the pH value.

According to the previously reported publications and due to the high abundance of urea in urine samples, a strong urea Raman mode located around 990 cm^{-1} is expected. Surprisingly, the samples investigated here show only a very

weak urea Raman signals. Besides urea, purine derivatives can be also expected to show characteristic SERS signals. These molecules are aromatic, thus, the delocalized electrons are easily polarizable leading to high Raman signals. One of these compounds present in urine is uric acid. Raman bands ascribed to the vibrations of this molecule are located at 485 cm^{-1} , 637 and 1123 cm^{-1} ^{19,50} (reference Raman and SERS spectrum in SI, Figure S6). Furthermore, the spectral feature in the $1350\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$ was assigned to the pyrrole half-ring symmetrical stretch within the heme molecule.¹⁸ The clear assignment of each single Raman band is cumbersome due to the high complexity of urine and it is beyond the aim of the current study.

After measuring the blank samples levofloxacin was added to the matrix in order to assess the potential of the technique to detect the target analyte in human urine. The prepared concentrations were chosen according to the expected values of levofloxacin in human urine after 4 h from administration. In Figure 4(B) the mean SERS spectra together with their double standard deviation for the spiked samples having a urinary concentration of 1.8 mM are shown. In spite of the rich Raman signature of the urine, the characteristic Raman modes of levofloxacin can be clearly distinguished at 1391 and 1611 cm^{-1} . This is due to the high scattering cross section of the aromatic moieties of the quinolone ring system and due to the efficient adsorption of the molecule on the surface of the Ag NPs.³⁹ The mean SERS spectra for all 12 differently concentrated spiked urine samples are shown in Figure S7. Levofloxacin was previously proved to induce the aggregation of Ag NPs³⁹ when solved in water. The same is observed for some of the investigated urine samples. Namely, in the case of S1, S3, and P0, where the SERS signal of the blank urine

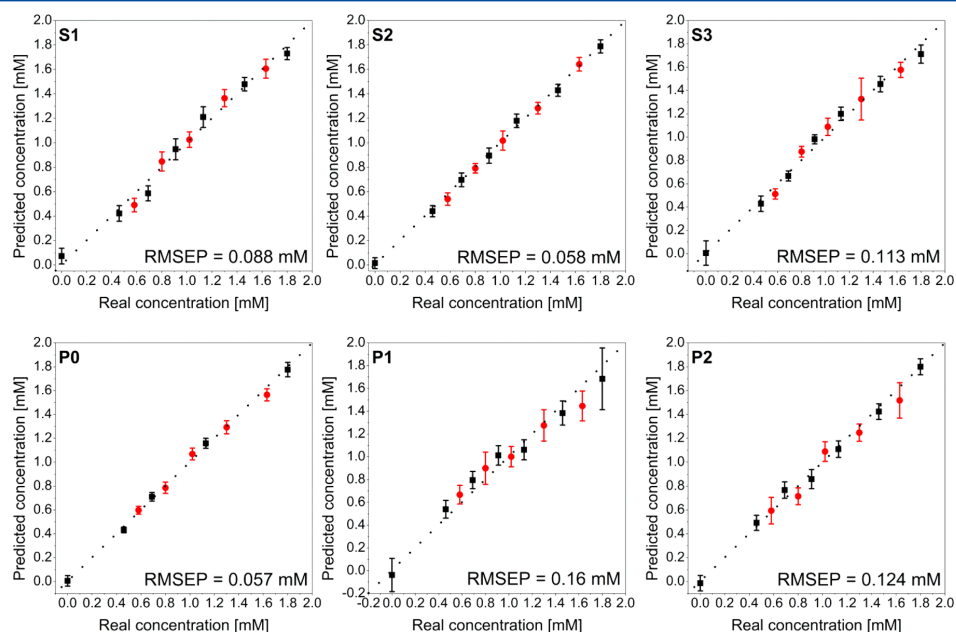


Figure 5. PLS prediction plots for spiked human urine samples using seven concentrations for training (black scatter) and five (red scatter) for predicting.

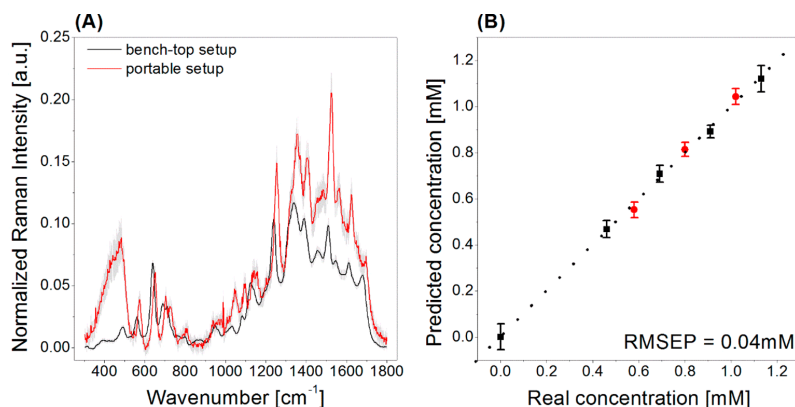


Figure 6. (A) Comparison of the mean SERS spectra of sample S3 spiked with levofloxacin, 0.46 mM urinary concentration; (B) PLS plot where the black scatter points are the training data set and the red scatter represent the predicted values.

showed weak Raman bands. Here, with the addition of the target analyte also the Raman modes characteristic for the urine components are gaining intensity. In order to rule out the influence of the different aggregation degree on the intensity of the SERS spectra the Raman mode at 637 cm^{-1} ascribed to uric acid was used as an internal standard (normalized SERS spectra in SI, Figure S8). The main reason for choosing this Raman mode rather than the one due to the vibration of Ag – (absorbed ion) is that uric acid is an intrinsic component of urine. Further details are presented in the SI section (Figure S9).

In order to test the feasibility of the LoC-SERS technique for quantitative measurements, the recorded data were divided in two sets. The first data set was used for training the PLS model; model applied for the prediction of the concentration values of the second data set. The results obtained by using seven concentrations for training (black scatter) and five concentrations for predicting (red scatter) are depicted in Figure 5. The best prediction was obtained for the samples S2 and P0 with an RMSEP value of 0.058 mM while for the others the value of the parameter ranged between 0.088 and 0.16 mM (for complete results see Table S3). Nevertheless, levofloxacin was detected for all samples in a 0.45–1.8 mM concentration range, regardless the treatment received by the patient. The determination of the exact LOD value was beyond the scope of the present paper. However, based on the mean SERS spectra and on the RMSEP values, one may expect that a concentration comparable to that obtained for the artificial urine should be detectable.

One of the main challenges of the SERS technique is represented by the reproducibility of the results when using different colloid batches. Therefore, the batch-to-batch colloid reproducibility was also tested. The first batch was seven months old, while the second one was freshly prepared. The experiment was carried out for sample S1. The obtained RMSEP value was 0.16 mM, and the plot is shown in Figure S10. Therefore, Ag NPs prepared according to the Leopold-Lendl protocol have a long shelf life and are easy to handle.

As already mentioned previously, a low-cost measurement setup is desirable. Therefore, besides the benchtop Raman setup a portable module has been also employed for detecting levofloxacin in human urine. The whole equipment has a small

footprint (SI, Figure S11(A)), being suitable for on-site and low cost applications. The same experimental design and data analysis was applied as for the results presented above. However, the measured sample, S3, was frozen again and kept at $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ for two additional months. By comparing the mean SERS spectra for the same urinary concentration measured with the two devices (Figure 6(A)), one may see that the relative intensities of some bands changed. This could be caused by the multiple freeze–thaw cycles applied during the study. Furthermore, it was also noticed that the SERS signal gets saturated once the concentration of the target molecule exceeds 1.3 mM (Figure S11(C)). Thus, only data points below this concentration have been used for the PLS analysis. With this, very good RMSEP values have been obtained (Figure 6(B)).

By comparing the data available in the literature concerning the expected urinary concentrations of levofloxacin with the ones detected by the LoC-SERS technique employed in this work, it can be concluded that the method has a high potential as a bioanalytical tool used for determining levofloxacin urine concentration in order to monitor the clearance rate or to assess patient compliance. First, a minimal sample preparation step consisting of filtration and dilution is required, followed by a fast measurement carried out under automated and reproducible measurement conditions. Second, the employed metallic nanoparticles are synthesized at room temperature, offering a good batch-to-batch reproducibility. And finally, the whole concentration window, including the minimum value of 0.45 mM, expected after 4 h from the administration of a single oral dose of 500 mg, is detected with good accuracy by a benchtop and a portable Raman setup.

CONCLUSIONS

The detection of levofloxacin was carried out in artificial and human urine using LoC-SERS. Artificial urine was chosen as a matrix in order to easily mimic patient samples and to get insights into the influence of various parameters on the SERS signal of the target analyte. More exactly, the signal decrease of levofloxacin solved in artificial urine as compared to the case where purified water was used as solvent was associated with (1) competition at the surface of the Ag NPs and (2) induction of large Ag NP aggregates. Furthermore, it was proven that the

time elapsed from the addition of the colloids to the analyte containing droplets plays a major role in order to get optimal enhancement with improved RSD values. In a last step, artificial urine was diluted with purified water. Here, even though the indroplet levofloxacin concentration is 1 order of magnitude lower when the highest amount of water is added, the signal is the most intense. Hence, this is another parameter which one may change in order to optimize the results. Concerning the achieved lower LODs, in the case of the nondiluted matrix, a value of 0.1 mM was achieved, while with dilution it was improved to 0.07 mM. The linear dynamic range is between 0.1–0.7 mM and 0.07–0.7 mM, respectively. This would suffice for monitoring the levofloxacin clearance after 12 h from the administration of a single oral dose of 500 mg. Similar with our previous publication, the use of the Raman band ascribed to the stretching vibrations of the Ag (absorbed ion) as an internal standard improved the linear dynamic range.

Concerning the human urine samples, the pH value and the osmotic concentration play an important role on the SERS signal intensity of the pure urine samples diluted with water. An acidic pH leads to a weaker signature as compared to the samples having a neutral or slightly basic pH. Besides urea, Raman characteristic bands for uric acid and heme molecules were identified. Here, the Raman band assigned to uric acid located at 637 cm^{-1} was used as an internal standard in order to rule out the influence of the different aggregation degree of the Ag NPs on the SERS spectra. Urinary concentrations of levofloxacin were detected in the range between 0.45 and 1.8 mM with an RMSEP value ranging from 0.057 to 0.16 mM in all three individual and three pooled samples. According to the literature, in the case of healthy volunteers after 4 h from the administration of a single oral dose of 500 mg levofloxacin, amounts were determined to be $1.38\text{ mM} \pm 0.68\text{ mM}$ with a minimum measured concentration of 0.45 mM. Therefore, with the LoC-SERS technique, it is possible to monitor the clearance of the target analyte or to assess patient compliance. Concerning the clinical application, it was shown that the chosen Ag NPs have a long shelf life and that the LoC-SERS technique can be combined with a portable setup.

In order to answer the question concerning the determination of levofloxacin concentrations of unknown urine samples, further studies will be conducted by employing the standard addition method. It was recently shown that the combination of LoC-SERS with standard addition results in quantitative measurements.⁵³ Furthermore, also the influence of multiple freeze–thaw cycles on the SERS signal will be investigated.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01005.

Table S1: description of the sample preparation, Table S2: detailed measurement layout, Figure S1: UV–vis spectra of pure and aggregated Ag NPs, Figure S2: SERS spectra of urea at different concentrations, Figure S3: mean SERS spectra and their double standard deviation recorded in order to get insight regarding the influence of the matrix complexity and its dilution with water on the SERS signal of levofloxacin, Figure S4: concentration dependent SERS signal of levofloxacin in artificial urine (without and with dilution), Figure S5: Normalized and

integrated peak area of the Raman mode at 1391 cm^{-1} ascribed to levofloxacin, Figure S6: Raman and SERS spectrum of uric acid, Figure S7: mean SERS spectra of the spiked human urine samples, Figure S8: normalized mean SERS spectra of the spiked human urine samples, Figure S9: PLS prediction plots for samples S3 without and with normalization, Table S3: summary of the PLS plots, Figure S10: PLS plots for batch-to-batch reproducibility of the SERS signal of the Ag NPs, Figure S11: portable Raman setup. (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Phone: +49 (0)3641-206309, Fax: +49 (0)3641-206399, e-mail: dana.cialla-may@uni-jena.de.

*Phone: +49 (0)3641-206300, Fax: +49 (0)3641-206399, e-mail: juergen.popp@leibniz-ipht.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The funding of the Ph.D. project of I. J. Hidi within the framework “Carl-Zeiss-Strukturmaßnahme” is gratefully acknowledged. The projects “QuantiSERS” (03IPT513A) and “Jenaer Biochip Initiative 2.0” (03IPT513Y) within the framework “InnoProfile Transfer – Unternehmen Region” as well as the grant 01KI1204 (M. W. Pletz) are supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF). BioInter (13022-715) and InfectoGnostics (13GW0096F) are funded by the Development Bank of Thuringia and the European Union (EFRE). We thank the microfluidic group of the IPHT for preparing the lab-on-a-chip devices for the measurements and Johanna Kirchhoff and Dr. Ute Neugebauer from the Institute of Medical Microbiology for providing the human urine samples.

■ REFERENCES

- (1) Pletz, M.; Lipman, J. Clinical Measures for Increased Creatinine Clearances and Suboptimal Antibiotic Dosing. *Intensive Care Med.* **2013**, *39*, 1322–1324.
- (2) Wagenlehner, F. M. E.; Kinzig-Schippers, M.; Tischmeyer, U.; Wagenlehner, C.; Sorgel, F.; Dalhoff, A.; Naber, K. G. Pharmacokinetics of Ciprofloxacin Xr (1000 Mg) Versus Levofloxacin (500 Mg) in Plasma and Urine of Male and Female Healthy Volunteers Receiving a Single Oral Dose. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 7–14.
- (3) Sun, H.; Wang, H.; Ge, X. Simultaneous Determination of the Combined Drugs of Ceftriaxone Sodium, Metronidazole, and Levofloxacin in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **2012**, *26*, 486–492.
- (4) Torre-Cisneros, J.; San-Juan, R.; Rosso-Fernandez, C. M.; Silva, J. T.; Munoz-Sanz, A.; Munoz, P.; Miguez, E.; Martin-Davila, P.; Lopez-Ruz, M. A.; Vidal, E.; et al. Tuberculosis Prophylaxis with Levofloxacin in Liver Transplant Patients Is Associated with a High Incidence of Tenosynovitis: Safety Analysis of a Multicenter Randomized Trial. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 1642–9.
- (5) Liu, Y. M.; He, Q.; Wu, M. Levofloxacin-Induced Crystal Nephropathy. *Nephrology* **2015**, *20*, 437–438.
- (6) Gulen, M.; Ay, M. O.; Avci, A.; Acikalin, A.; Icme, F. Levofloxacin-Induced Hepatotoxicity and Death. *Am. J. Ther.* **2015**, *22*, E93–E96.
- (7) Czyrski, A.; Kondys, K.; Szalek, E.; Karbownik, A.; Grzeskowiak, E. The Pharmacokinetic Interaction between Levofloxacin and Sunitinib. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 542–4.

- (8) Fayyaz, M.; Yousuf, R. I.; Shoaib, M. H.; Ali, T.; Nasiri, I.; Ashraf, N. Quality Evaluation and in Vitro Interaction Studies Between Levofloxacin 250mg and Diclofenac Sodium 50mg Tablets. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2015**, *28*, 119–128.
- (9) Budny, A. M.; Ley, A. N. Fluoroquinolone-Mediated Achilles Rupture: A Case Report and Review of the Literature. *J. Foot Ankle Surg.* **2015**, *54*, 494–496.
- (10) Bansal, N.; Manocha, D.; Madhira, B. Life-Threatening Metabolic Coma Caused by Levofloxacin. *Am. J. Ther.* **2015**, *22*, E48–E51.
- (11) Gao, C. H.; Yu, L. S.; Zeng, S.; Huang, Y. W.; Zhou, Q. Personalized Therapeutics for Levofloxacin: A Focus on Pharmacokinetic Concerns. *Ther. Clin. Risk Manage.* **2014**, *10*, 217–227.
- (12) Wagenlehner, F. M.; Kinzig-Schippers, M.; Sorgel, F.; Weidner, W.; Naber, K. G. Concentrations in Plasma, Urinary Excretion and Bactericidal Activity of Levofloxacin (500 Mg) Versus Ciprofloxacin (500 Mg) in Healthy Volunteers Receiving a Single Oral Dose. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *28*, 551–9.
- (13) Wagenlehner, F. M.; Kinzig-Schippers, M.; Tischmeyer, U.; Wagenlehner, C.; Sorgel, F.; Naber, K. G. Urinary Bactericidal Activity of Extended-Release Ciprofloxacin (1,000 mg) Versus Levofloxacin (500 mg) in Healthy Volunteers Receiving a Single Oral Dose. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3947–9.
- (14) Zhou, M. Q.; Peng, J. D.; He, R. X.; He, Y. T.; Zhang, J.; Li, A. P. High Performance Liquid Chromatography Coupled with Resonance Rayleigh Scattering for the Detection of Three Fluoroquinolones and Mechanism Study. *Spectrochim. Acta, Part A* **2015**, *136*, 1181–1187.
- (15) Cazorla-Reyes, R.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Rodríguez Maresca, M. A.; Martínez Vidal, J. L. Simultaneous Analysis of Antibiotics in Biological Samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *89*, 203–212.
- (16) Siewert, S. Validation of a Levofloxacin Hplc Assay in Plasma and Dialysate for Pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1360–1362.
- (17) Rambla-Alegre, M.; Esteve-Romero, J.; Carda-Broch, S. Validation of a Mlc Method with Fluorescence Detection for the Determination of Quinolones in Urine Samples by Direct Injection. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 3975–3981.
- (18) Chi, J. M.; Zaw, T.; Cardona, I.; Hosnain, M.; Garg, N.; Lefkowitz, H. R.; Tolia, P.; Du, H. Use of Surface-Enhanced Raman Scattering as a Prognostic Indicator of Acute Kidney Transplant Rejection. *Biomed. Opt. Express* **2015**, *6*, 761–769.
- (19) Del Mistro, G.; Cervo, S.; Mansutti, E.; Spizzo, R.; Colombatti, A.; Belmonte, P.; Zucconelli, R.; Steffan, A.; Sergio, V.; Bonifacio, A. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Urine for Prostate Cancer Detection: A Preliminary Study. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 3271–3275.
- (20) Liang, J.; Liu, H.; Huang, C.; Yao, C.; Fu, Q.; Li, X.; Cao, D.; Luo, Z.; Tang, Y. Aggregated Silver Nanoparticles Based Surface-Enhanced Raman Scattering Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ultrasensitive Detection of Protein Biomarkers and Small Molecules. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5790–6.
- (21) Cao, G. Y.; Hajisalem, G.; Li, W.; Hof, F.; Gordon, R. Quantification of an Exogenous Cancer Biomarker in Urinalysis by Raman Spectroscopy. *Analyst* **2014**, *139*, 5375–5378.
- (22) Dong, R. L.; Weng, S. Z.; Yang, L. B.; Liu, J. H. Detection and Direct Readout of Drugs in Human Urine Using Dynamic Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Support Vector Machines. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2937–2944.
- (23) Zhang, Y.; Walkenfort, B.; Yoon, J. H.; Schlucker, S.; Xie, W. Gold and Silver Nanoparticle Monomers Are Non-Sers-Active: A Negative Experimental Study with Silica-Encapsulated Raman-Reporter-Coated Metal Colloids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21120–21126.
- (24) Li, M.; Du, Y.; Zhao, F. S.; Zeng, J. B.; Mohan, C.; Shih, W. C. Reagent- and Separation-Free Measurements of Urine Creatinine Concentration Using Stamping Surface Enhanced Raman Scattering (S-Sers). *Biomed. Opt. Express* **2015**, *6*, 849–858.
- (25) Zhao, L. L.; Blackburn, J.; Brosseau, C. L. Quantitative Detection of Uric Acid by Electrochemical-Surface Enhanced Raman Spectroscopy Using a Multi Layered Au/Ag Substrate. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 441–447.
- (26) Tadele Alula, M. T.; Yang, J. Photochemical Decoration of Magnetic Composites with Silver Nanostructures for Determination of Creatinine in Urine by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Talanta* **2014**, *130*, 55–62.
- (27) Li, M. X.; Yang, H.; Li, S. Q.; Liu, C. W.; Zhao, K.; Li, J. G.; Jiang, D. N.; Sun, L. L.; Wang, H.; Deng, A. P. An Ultrasensitive Competitive Immunochromatographic Assay (Ica) Based on Surface-Enhanced Raman Scattering (Sers) for Direct Detection of 3-Amino-5-Methylmorpholino-2-Oxazolidinone (Amoz) in Tissue and Urine Samples. *Sens. Actuators, B* **2015**, *211*, 551–558.
- (28) Xu, S. C.; Man, B. Y.; Jiang, S. Z.; Wang, J. H.; Wei, J.; Xu, S. D.; Liu, H. P.; Gao, S. B.; Liu, H. L.; Li, Z. H.; et al. Graphene/Cu Nanoparticle Hybrids Fabricated by Chemical Vapor Deposition as Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate for Label-Free Detection of Adenosine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 10977–10987.
- (29) Yang, T.; Guo, X.; Wu, Y.; Wang, H.; Fu, S.; Wen, Y.; Yang, H. Facile and Label-Free Detection of Lung Cancer Biomarker in Urine by Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 20985–93.
- (30) Choi, C. J.; Wu, H. Y.; George, S.; Weyhenmeyer, J.; Cunningham, B. T. Biochemical Sensor Tubing for Point-of-Care Monitoring of Intravenous Drugs and Metabolites. *Lab Chip* **2012**, *12*, 574–581.
- (31) Kong, K. V.; Ho, C. J.; Gong, T.; Lau, W. K.; Olivo, M. Sensitive Sers Glucose Sensing in Biological Media Using Alkyne Functionalized Boronic Acid on Planar Substrates. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 186–91.
- (32) Yuen, C.; Liu, Q. Towards in Vivo Intradermal Surface Enhanced Raman Scattering (Sers) Measurements: Silver Coated Microneedle Based Sers Probe. *Journal of Biophotonics* **2014**, *7*, 683–689.
- (33) Sun, F.; Bai, T.; Zhang, L.; Ella-Menye, J. R.; Liu, S. J.; Nowinski, A. K.; Jiang, S. Y.; Yu, Q. M. Sensitive and Fast Detection of Fructose in Complex Media Via Symmetry Breaking and Signal Amplification Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2387–2394.
- (34) Mamian-Lopez, M. B.; Poppi, R. J. Standard Addition Method Applied to the Urinary Quantification of Nicotine in the Presence of Cotinine and Anabasine Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Multivariate Curve Resolution. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *760*, 53–59.
- (35) Eberhardt, K.; Stiebing, C.; Matthäus, C.; Schmitt, M.; Popp, J. Advantages and Limitations of Raman Spectroscopy for Molecular Diagnostics: An Update. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15*, 773–787.
- (36) Ryzhikova, E.; Kazakov, O.; Halamkova, L.; Celmins, D.; Malone, P.; Molho, E.; Zimmerman, E. A.; Lednev, I. K. Raman Spectroscopy of Blood Serum for Alzheimer's Disease Diagnostics: Specificity Relative to Other Types of Dementia. *Journal of Biophotonics* **2015**, *8*, 584–596.
- (37) Cialla, D.; Marz, A.; Bohme, R.; Theil, F.; Weber, K.; Schmitt, M.; Popp, J. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (Sers): Progress and Trends. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 27–54.
- (38) Buividas, R.; Dzingelevičius, N.; Kubiliūtė, R.; Stoddart, P. R.; Khanh Truong, V.; Ivanova, E. P.; Juodkazis, S. Statistically Quantified Measurement of an Alzheimer's Marker by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Journal of Biophotonics* **2015**, *8*, 567–574.
- (39) Hidi, I. J.; Jahn, M.; Weber, K.; Cialla-May, D.; Popp, J. Droplet Based Microfluidics: Spectroscopic Characterization of Levofloxacin and Its Sers Detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21236–21242.
- (40) Walter, A.; Marz, A.; Schumacher, W.; Rosch, P.; Popp, J. Towards a Fast, High Specific and Reliable Discrimination of Bacteria

on Strain Level by Means of SERS in a Microfluidic Device. *Lab Chip* **2011**, *11*, 1013–1021.

(41) Leopold, N.; Lendl, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5723–5727.

(42) Yang, Y.; Kim, S.; Chae, J. Separating and Detecting Escherichia Coli in a Microfluidic Channel for Urinary Tract Infection Applications. *J. Microelectromech. Syst.* **2011**, *20*, 819–827.

(43) Saetun, P.; Semangoen, T.; Thongboonkerd, V. Characterizations of Urinary Sediments Precipitated after Freezing and Their Effects on Urinary Protein and Chemical Analyses. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **2009**, *296*, F1346–F1354.

(44) März, A.; Ackermann, K. R.; Malsch, D.; Bocklitz, T.; Henkel, T.; Popp, J. Towards a Quantitative SERS Approach – Online Monitoring of Analytes in a Microfluidic System with Isotope-Edited Internal Standards. *J. Biophotonics* **2009**, *2*, 232–242.

(45) Team, R. D. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing; The R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2011; ISBN: 3-900051-07-0.

(46) Ryan, C. G.; Clayton, E.; Griffin, W. L.; Sie, S. H.; Cousens, D. R. Snip, a Statistics-Sensitive Background Treatment for the Quantitative-Analysis of Pixe Spectra in Geoscience Applications. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **1988**, *34*, 396–402.

(47) Mevik, B.-H.; Wehrens, R.; Liland, K. H. *Pls: Partial Least Squares and Principal Component Regression* **2011**.

(48) Bocklitz, T.; Walter, A.; Hartmann, K.; Rösch, P.; Popp, J. How to Pre-Process Raman Spectra for Reliable and Stable Models? *Anal. Chim. Acta* **2011**, *704*, 47–56.

(49) Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A. C.; Wilson, M. R.; Knox, C.; Bjorn Dahl, T. C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; et al. The Human Urine Metabolome. *PLoS One* **2013**, *8*, e73076.

(50) Huang, S. H.; Wang, L.; Chen, W. S.; Feng, S. Y.; Lin, J. Q.; Huang, Z. F.; Chen, G. N.; Li, B. H.; Chen, R. Potential of Non-Invasive Esophagus Cancer Detection Based on Urine Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Laser Phys. Lett.* **2014**, *11*, 1–6.

(51) Gunasekaran, S.; Rajalakshmi, K.; Kumaresan, S. Vibrational Analysis, Electronic Structure and Nonlinear Optical Properties of Levofloxacin by Density Functional Theory. *Spectrochim. Acta, Part A* **2013**, *112*, 351–63.

(52) Bonifacio, A.; Cervo, S.; Sergio, V. Label-Free Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Biofluids: Fundamental Aspects and Diagnostic Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 8265–8277.

(53) Kämmer, E.; Olschewski, K.; Stöckel, S.; Rösch, P.; Weber, K.; Cialla-May, D.; Bocklitz, T.; Popp, J. Quantitative SERS Studies by Combining Loc-SERS with the Standard Addition Method. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 8925–8929.

Supporting Information

Towards Levofloxacin Monitoring in Human Urine Samples by Employing the LoC-SERS Technique

*Izabella J. Hidi,^{1,2} Martin Jahn,^{1,2} Mathias W. Pletz,³ Karina Weber,^{1,2} Dana Cialla-May,^{1,2}
Jürgen Popp^{1,2}*

¹Friedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of
Photonics, Helmholtzweg 4, 07745 Jena, Germany

²Leibniz Institute of Photonic Technology Jena, Albert-Einstein-Str. 9, 07745 Jena, Germany

³Center for Infectious Diseases and Infection Control, Jena University Hospital, Erlanger Allee
101 07740 Jena, and Research Campus Infectognostic, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Germany,
Germany

Spiking human urine samples with levofloxacin

LoC-SERS measurements were done on mixtures containing three parts (75 μ l) of human urine and eleven parts (275 μ l) of water and/or levofloxacin aqueous solutions. Table **S1** contains the number of levofloxacin moles present in each solution and two different concentrations. The first one, c_{urine} , is a “virtual” concentration and it is equivalent to the total number of levofloxacin moles which would be present in the 75 μ l urine sample. The second one, $c_{\text{in-droplet}}$, corresponds to the total number of levofloxacin moles in the final volume (350 μ l).

Table S1. Spiked human urine solutions used for measurements.

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
n_{total} [nmol]	0	35.0	43.5	52.0	60.0	68.5	77.0	85.0	97.5	110.0	122.5	135.0
c_{urine} [mM]	0	0.467	0.58	0.694	0.8	0.913	1.027	1.133	1.3	1.467	1.63	1.8
$c_{\text{in-droplet}}$ [mM]	0	0.1	0.124	0.149	0.171	0.196	0.220	0.243	0.279	0.314	0.350	0.386

$$c_{\text{urine}} = n_{\text{total}} / V_{\text{urine}}, \text{ where } V_{\text{urine}} = 75 \mu\text{l}; c_{\text{in-droplet}} = n_{\text{total}} / V_{\text{total}}, \text{ where } V_{\text{total}} = 350 \mu\text{l};$$

Table S2. Measurement design.

	Measurement #					
Port #	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	solution 0, 3	blocked	levo/SU 0.5 mM	levo/SU 0.5 mM	levo/SU/H ₂ O 0.1 mM, 1 mM	spiked urine
2	solution 1, 4	levo/SU 0.5 mM	blocked	SU	SU/H ₂ O	blocked
3	solution 2	blocked	H ₂ O	levo/SU 1 mM	levo/SU/H ₂ O 0.5 mM	Ag colloid
4	Ag colloid					blocked
5	blocked					
focus position	I	I-IV	I	I and IV	I	II

The five different ports and the focus positions are depicted in Scheme 1.

M1: the influence of matrix components on the SERS signal of levofloxacin. The first solution 1, contained NH₄Cl, CaCl₂, Na₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O, Na₂HPO₄ and NaC₆H₇O₇. Solution 2 contained additionally to the aforementioned salts also KCl and NaCl. For solution 3, urea was further added, while with the addition of creatinine, solution 4 is equal to the artificial urine itself. As reference, purified water was used as solvent (solution 0).

M2: aggregation time dependent SERS measurements (I = 40s, II= 60s, III = 96 s, IV= 136 s);

M3: the influence of dilution with H₂O of the simulated urine matrix on the SERS signal of levofloxacin;

M4: concentration dependent SERS signal of levofloxacin in simulated urine;

M5: concentration dependent SERS signal of levofloxacin in simulated urine diluted with H₂O in 8:6 ratio;

M6: concentration rows of spiked human urine samples.

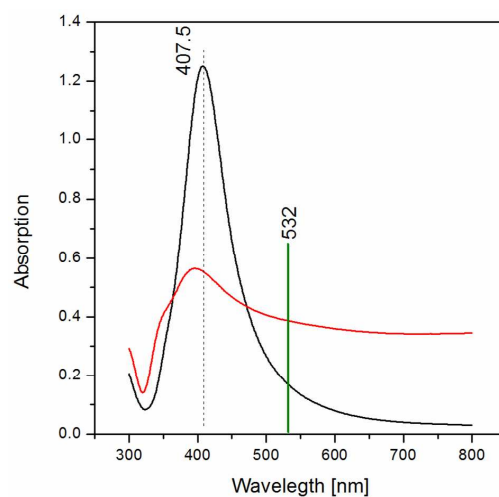


Figure S1. UV-Vis spectra of Ag NPs diluted with water (black) (AgNPs:H₂O = 1:1.2) and of the aggregated Ag NPs (AgNPs:H₂O:1 M KCl=1:1:0.2).

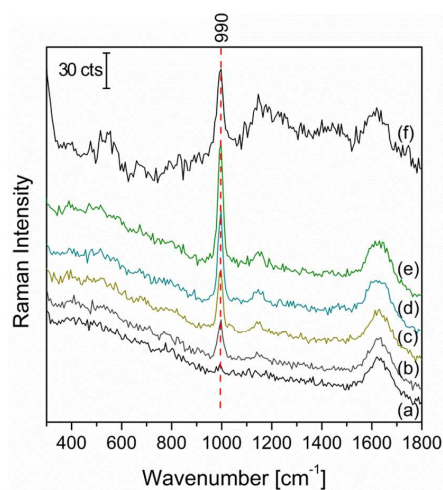


Figure S2. SERS spectrum of urea having a concentration of (a) 32.5 mM, (b) 232.5 mM, (c) 432.5 mM, (d) 632.5 mM, (e) 832.5 mM and (f) simulated urine.

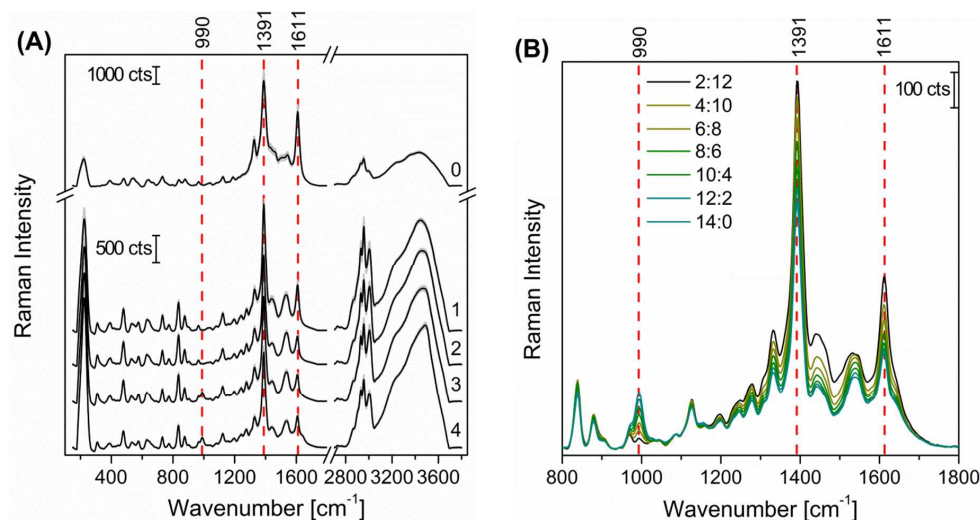


Figure S3. (A) Mean SERS signal and its double standard deviation recorded on Solution 0-4 in the experiment **M1**. (B) Mean SERS signal for seven simulated urine:water ratio, experiment **M3**. In both cases the Raman characteristic mode for urea (990 cm^{-1}) and two Raman marker bands for levofloxacin (1391 and 1611 cm^{-1}) are also indicated.

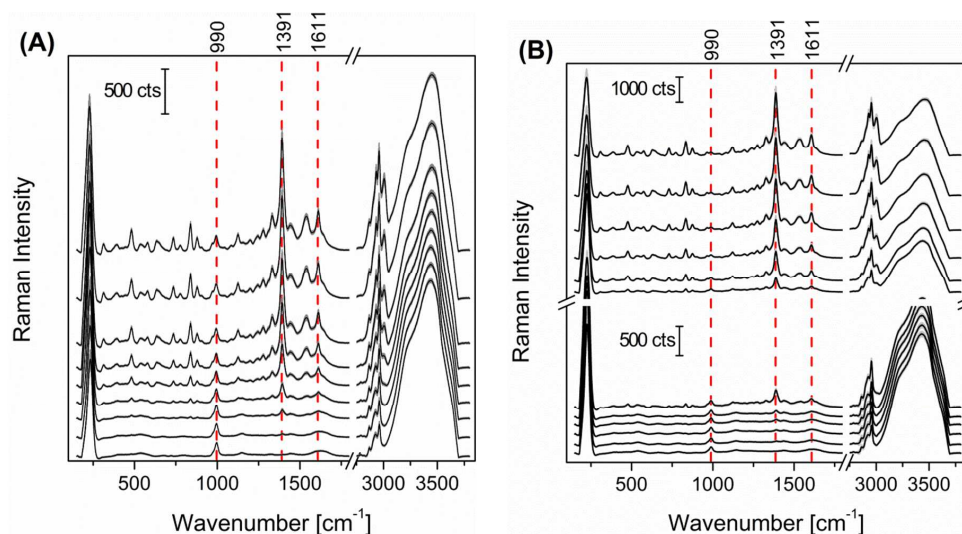


Figure S4. Concentration dependent SERS signal for (A) levofloxacin in simulated urine, 40 s aggregation time and (B) levofloxacin/simulated urine: H_2O = 8:6, 40 s aggregation time. For (A) the measured concentrations are (bottom to top): 0, 0.1, 0.175, 0.25, 0.4, 0.55, 0.7, 0.85 and 1 mM, while for (B) 0, 0.055, 0.07, 0.085, 0.1, 0.175, 0.25, 0.4, 0.55, 0.7, 0.85 and 1 mM.

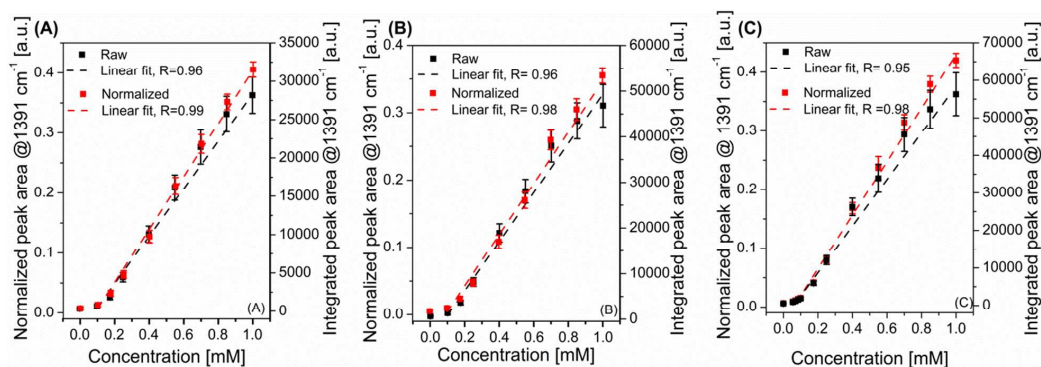


Figure S5. Normalized and integrated peak area of the Raman mode at 1391 cm^{-1} for (A) not diluted simulated urine and aggregation time 136 s, (B) not diluted 40 s, (C) diluted 40 s. The data points were fitted with a linear regression. For comparison the adjusted r-square values are shown for every fit.

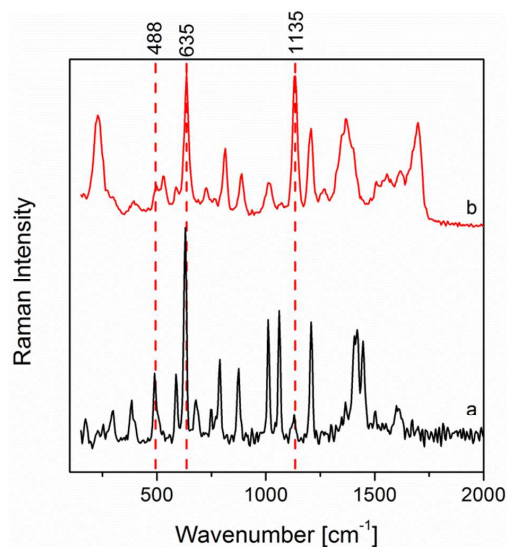


Figure S6. (a) Raman spectrum of uric acid sodium salt powder, (b) cuvette based SERS spectrum of 1mM uric acid sodium salt.

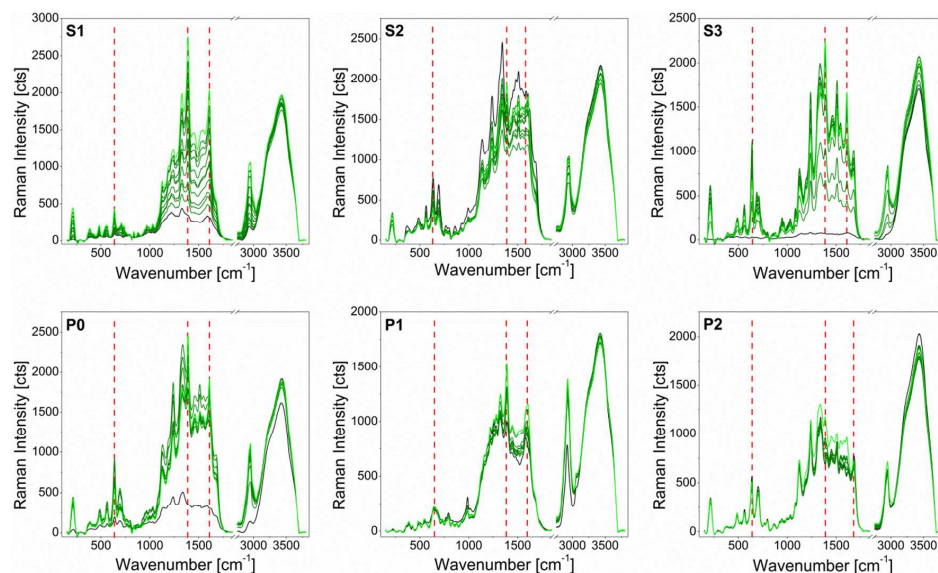


Figure S7. Mean SERS spectra of the spiked human urine samples: (black) pure urine, (olive) from bottom to top: 0.45 mM, 0.58 mM, 0.69 mM, 0.8 mM, 0.91 mM, 1.02 mM, 1.13 mM, 1.3 mM, 1.46 mM and 1.63 mM, (green) 1.8 mM.

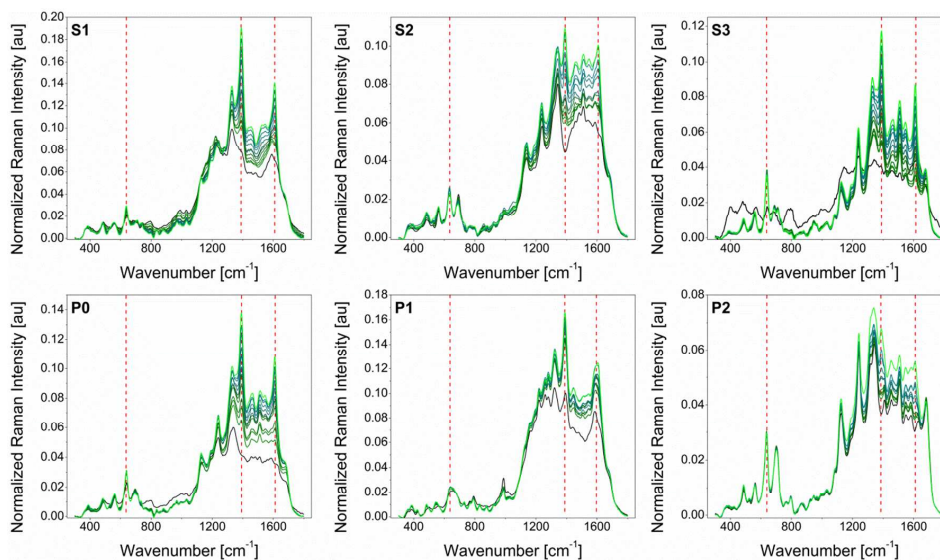


Figure S8. Normalized mean SERS spectra of the spiked human urine samples. (black) pure urine, (olive) from bottom to top: 0.45 mM, 0.58 mM, 0.69 mM, 0.8 mM, 0.91 mM, 1.02 mM, 1.13 mM, 1.3 mM, 1.46 mM and 1.63 mM, (green) 1.8 mM.

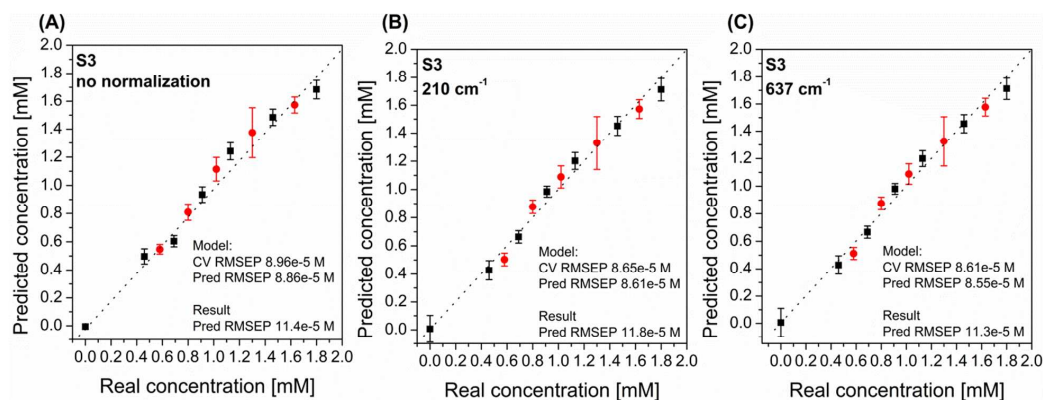


Figure S9. PLS prediction plots for samples S3 using: (A) raw data, (B) normalized data using the Raman mode at 210 cm⁻¹ and (C) normalized data using the Raman mode at 637 cm⁻¹. Black scatter plot: concentrations used for training the PLS model; red scatter plot: predicted concentrations. For the model cross validation (CV) and prediction on the same data set RMSEP values are given while for the result the prediction RMSEP using the previously created model is shown.

Table S3. Summary of the PLS results.

	S1		S2		S3		P0		P1		P2	
	CV [mM]	RMSEP [mM]	CV [mM]	RMSEP [mM]	CV [mM]	RMSEP [mM]	CV [mM]	RMSEP [mM]	CV [mM]	RMSEP [mM]	CV [mM]	RMSEP [mM]
Model	0.095	0.094	0.059	0.055	0.086	0.086	0.053	0.052	0.16	0.16	0.081	0.080
Result		0.088		0.058		0.113		0.057		0.16		0.124

CV: cross validation. RMSEP: root mean square error of prediction.

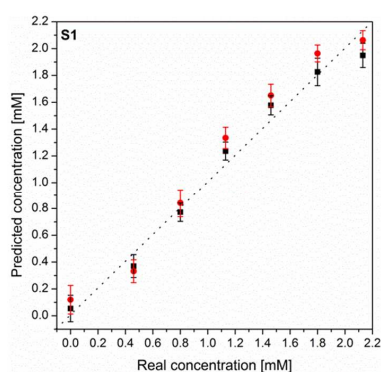


Figure S10. PLS results for S1 urine sample measured using with two different colloid batches.

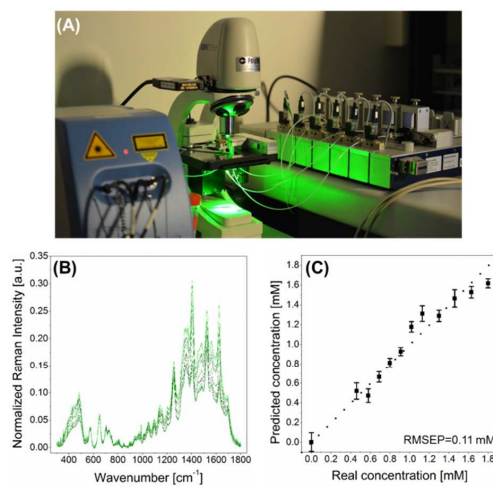


Figure S11 (A) Picture of the LoC-SERS setup combined with a portable Raman setup; (B) mean SERS spectra of spiked S3 sample measured with the portable setup; (C) PLS plot where the same data set is used for training and predicting.

**1.6. Lab-on-a-Chip-Surface Enhanced Raman Scattering
Combined with the Standard Addition Method: Toward
the Quantification of Nitroxoline in Spiked Human Urine
Samples [IH4]**

Izabella J. Hidi, Martin Jahn, Karina Weber, Thomas W. Bocklitz, Mathias W.
Pletz, Dana Cialla-May und Jürgen Popp

Anal. Chem., 2016, 88, 9173 – 9180

Reprinted with kind permission from the American Chemical Society,
Copyright © 2016.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b02316>

Lab-on-a-Chip-Surface Enhanced Raman Scattering Combined with the Standard Addition Method: Toward the Quantification of Nitroxoline in Spiked Human Urine Samples

Izabella J. Hidi,^{†,‡,⊥} Martin Jahn,^{†,‡,⊥} Karina Weber,^{†,‡,||} Thomas Bocklitz,[†] Mathias W. Pletz,^{§,||} Dana Cialla-May,^{*,†,‡,||} and Juergen Popp^{†,‡,||}

[†]Friedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07745 Jena, Germany

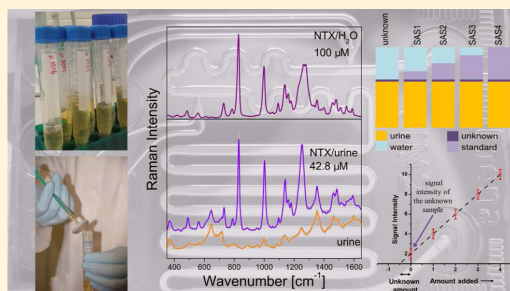
[‡]Leibniz Institute of Photonic Technology Jena, Albert-Einstein-Strasse 9, 07745 Jena, Germany

[§]Center for Infectious Diseases and Infection Control, Jena University Hospital, Erlanger Allee 101 07740 Jena, Germany

^{||}Research Campus Infectonostic, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: The emergence of antibacterial resistance and the development of new drugs lead to a continuous change of guidelines for medical treatments. Hence, new analytical tools are required for the detection of drugs in biological fluids. In this study, the first surface enhanced Raman scattering (SERS) detection of nitroxoline (NTX) in purified water and in spiked human urine samples is reported. Insights concerning the nature of the molecule–metal interaction and its influence on the overall SERS signal are provided. Furthermore, three randomly collected urine samples originating from a healthy volunteer were spiked to assess the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), and the linear dynamic range of the lab-on-a-chip SERS (LoC-SERS) method for NTX detection in human urine. The LOD is $\sim 3 \mu\text{M}$ (0.57 mg/L), $\text{LOQ} \sim 6.5 \mu\text{M}$ (1.23 mg/L) while the linear range is between 4.28 and $42.8 \mu\text{M}$ ($0.81\text{--}8.13 \text{ mg/L}$). This covers the minimum inhibitory concentration (MIC) values of the most commonly encountered uropathogens. Finally, seven clinical samples having an “unknown” NTX concentration were simulated. The LoC-SERS technique combined with the standard addition method and statistical data analysis provided a good prediction of the unknown concentrations. Additionally, it is also demonstrated that the predictions carried out by multicurve resolution alternating least-squares (MCR-ALS) algorithm provides reliable results, and it is preferred to a univariate statistical approach.



The guidelines describing the treatment of bacterial infections change throughout the years because of either the occurrence of antibacterial resistances or because of the discovery of new, more potent antibiotics. For many years, patients with urinary tract infection (UTI) were treated with trimethoprim as a single agent or in combination with sulfamethoxazole. However, if the regional resistance rate against the two antibiotics is higher than 20%,¹ this is no longer recommended. The same is true for the case of fluoroquinolones prescribed for the treatment of cystitis and acute pyelonephritis.¹ Therefore, alternative drugs are needed.

Nitroxoline (NTX), or 5-nitro-8-hydroxyquinoline, is an old but almost unknown antimicrobial agent. NTX chelates the divalent cations required for bacterial RNA polymerase.^{2,3} Because of this unique mechanism of action, there is no cross resistance between NTX and other antibiotics.⁴ In the 1960s it was licensed for the treatment of UTI⁵ because of its favorable pharmacokinetics with short-term, low plasma levels, and almost complete renal excretion.⁶ Because of the low license

hurdles at that time, there are very few clinical studies on NTX and this drug was not considered in current guidelines on UTIs. However, because of rising resistance rates of urinary pathogens to most recommended treatment options, NTX is now seen as a valuable alternative and has recently been reevaluated by the German Antimicrobial Susceptibility Testing Committee.⁷ The minimum inhibitory concentration (MIC) is $2\text{--}4 \text{ mg/L}$ ($10.5\text{--}21.0 \mu\text{M}$) for various *E. coli* strains, 4 mg/L ($21.0 \mu\text{M}$) for *K. pneumoniae* and 8 mg/L ($42.1 \mu\text{M}$) for *Proteus mirabilis* and *S. saprophyticus*.^{7,8} These values are in the susceptible range, while MICs $\geq 16 \text{ mg/L}$ ($84.2 \mu\text{M}$) are regarded as resistant. Subtherapeutic urine concentration of antibiotics is a frequent cause of treatment failure and consecutive resistance development. However, literature focusing on analytical methods for

Received: June 15, 2016

Accepted: August 29, 2016

Published: August 29, 2016



ACS Publications

© 2016 American Chemical Society

9173

DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02316
Anal. Chem. 2016, 88, 9173–9180

NTX detection in body fluids is very scarce. The antibiotic was determined in human urine by liquid chromatography⁹ combined with mass spectrometry⁸ and in human blood by electroreduction.^{9,10}

Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) was proven to have a high potential for bioanalytical applications.^{11–13} The main drawbacks of SERS represented by low reproducibility and lack of automated measurement conditions can be easily overcome by combining it with lab-on-a-chip (LoC) platforms.^{14–16} We have recently shown that levofloxacin, a second-generation fluoroquinolone, can be detected with great accuracy by the LoC-SERS method in spiked urine samples of UTI patients.¹⁴ However, the question how to determine the concentration of the antibiotic in clinical samples (originating from patients under medical treatment) has not been answered. Traditionally, quantitative measurements rely on a *priori* established calibration curves. However, if the chemical composition of the sample with the unknown analyte concentration is just slightly different as compared with the chemical composition of the standard solutions used for calibration, the obtained results might be unreliable. This is especially the case for clinical samples. The osmotic concentration of urine samples collected from different patients, or from the same patient at different time points, will strongly vary. Furthermore, the well-known poor batch-to-batch reproducibility of metallic nanoparticles in colloidal solution inhibits traditional quantitative determinations. Instead, the attention of the SERS community was directed toward the standard addition method (SAM).^{16–18} Here, all analytical measurements, including the calibration curve, are performed using the clinical sample itself. Therefore, neither the matrix effect nor the quality variation between colloid batches will have a significant impact on the results. Practically, the SAM experiments are carried out by measuring the signal of several solutions containing the same volume of the clinical sample and different volumes of the standard solution of the target molecule and the solvent (i.e., water). Then, the analytical response of the solutions is plotted as a function of the added amount of the standard and the intercept of the linear regression with the x axis will give the concentration of the analyte in the unknown sample.

In the current study, the SERS detection of NTX is presented. To the best of our knowledge, no previous SERS studies of the antibiotic have been reported yet. Therefore, in the first part of the study NTX was solved in purified water to get insight concerning the nature of the molecule–metal interaction and its influence on the overall SERS signal. In the second part, three randomly collected human urine samples of a healthy volunteer are used as matrix to assess the potential of the LoC-SERS technique to detect NTX in complex matrices. Lastly, urine samples originating from individuals, two from healthy volunteer and five from patients, with no previous NTX intake were spiked to simulate clinical samples. The as prepared “unknown” concentration was predicted by applying uni- and multivariate statistical data analysis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents. NTX (96%), silver nitrate (ACS reagent, 99%), hydroxylamine hydrochloride (ReagentPlus, 99%), and sodium hydroxide have been purchased from Sigma-Aldrich, whereas potassium chloride ($\geq 99.5\%$ p.a. ACS, ISO) from Carl Roth.

Silver Nanoparticle (Ag NP) Synthesis. The silver colloidal solution was prepared by reducing silver nitrate by hydroxylamine hydrochloride in the presence of sodium hydroxide at room temperature.^{14,19} The final concentration of the reactants in the solution is 10^{-3} M silver nitrate, 1.5×10^{-3} M hydroxylamine hydrochloride, and 0.3×10^{-3} M sodium hydroxide. The as-prepared solution was stored at 4 °C until the measurements were performed. In a previous study, the stability of the as prepared nanoparticles up to 7 months was demonstrated.¹⁴

NTX Solutions. A stock solution of NTX at 100 μ M was prepared by adding the appropriate amount of powder to high-purity water followed by ultrasonication for 1 h at 40 °C. A second solution, at 10 μ M, was obtained by diluting the previous solution with high-purity water. For the aggregation of the Ag NPs KCl at 1 M was used.

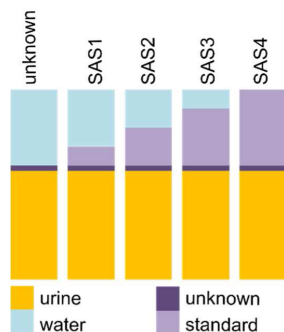
Urine Samples. In total, 10 human urine samples were included for the present study. Five samples were randomly collected from a healthy volunteer, while five other ones were received from the Institute of Medical Microbiology, University Hospital Jena, and originated from UTI patients. None of the individuals has undergone treatment with NTX. The analysis of human urine samples of both, healthy volunteer (4599-10/15) and patients (3701-02/13) was approved by the local Ethical Committee. Informed consent form was waived for the urine samples from patients because these samples were left over volumes of routine analysis and were anonymized. After sample collection, filtration was carried out for sterilization and for removing cells and debris using a sterile syringe filter (Rotilabo-syringe filter, PVDF, sterile, pore size 0.22 μ m). The urine samples of the healthy volunteer were measured short after collection, whereas the ones from patients were kept in the freezer at -21 °C for 8 months before the measurements were performed. For assessing the analytical performances of LoC-SERS for detecting NTX in human urine, three urine samples collected from the healthy volunteer HV1, HV2, and HV3 were spiked with NTX to yield urinary concentrations in the 4.28–42.8 μ M range. To do so, 700 μ L of urine was mixed with 300 μ L of NTX aqueous solution at different concentrations (see Table S1 in the Supporting Information for details).

As none of the individuals consumed NTX before urine sample collection, for SAM measurements, the clinical samples had to be simulated. This was achieved by spiking human urine (250 μ L) with a small volume (76 μ L) of highly concentrated (~ 70 μ M) NTX aqueous solution. The “unknown” NTX urinary concentration to be determined with LoC-SERS-SAM is ~ 21 μ M (4 mg/L). Two samples from the healthy volunteer HV4 and HV5 and five from patients, PS1, PS2, PS3, PS4, and PS5 were employed as a complex matrix. For each sample, except PS4, four standard addition steps (SAS) were prepared by adding purified water or/and NTX standard solution in different volumes (Scheme 1). In the case of sample PS4, due to low volume available, only three SAS were measured. Table S2 presents the detailed description of the prepared solutions.

Instrumentation. UV–vis absorption spectra were recorded in the 250–850 nm spectral range with a Jasco V650 diode array spectrophotometer. The acquisition speed was set to 200 nm/min and the spectral resolution to 1 nm.

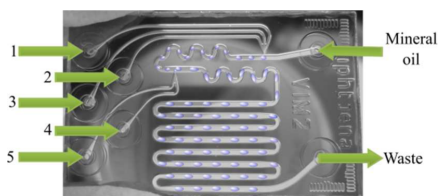
The reference Raman spectrum of NTX powder was recorded with a confocal Raman microscope model alpha300 R (WITec, Ulm, Germany) and a 50 \times Zeiss objective. An excitation wavelength of 785 nm was provided by a cw diode laser (Toptica Photonics, Gräfelingen, Germany).

Scheme 1. Standard Addition Method



The SERS and LoC-SERS spectra were acquired with an XploRA INV inverted Raman microscope from Horiba Scientific. This Raman setup was equipped with a laser emitting at 532 nm with 13 mW power at the sample surface and a thermoelectrically cooled CCD camera ($-69\text{ }^{\circ}\text{C}$). During the measurements, the same objective (Nikon $20\times\ 0.4\ \text{N.A.}$) was used for focusing the laser beam on the sample's surface and for collecting the backscattered photons. The reference SERS spectrum of NTX was recorded with the 2400 1/mm grating ($\sim 1.8\ \text{cm}^{-1}$ resolution), 1 s integration time and 10 accumulations. For the LoC-SERS measurements of NTX solved in purified water, the grating was changed to 1200 1/mm ($\sim 5\ \text{cm}^{-1}$ resolution), whereas in the case of the urine samples the 600 1/mm grating ($\sim 8\ \text{cm}^{-1}$) was used.

For the LoC-SERS measurements, a glass droplet based microfluidic chip (Scheme 2)^{14,16} was mounted on the

Scheme 2. Droplet Based Microfluidic Platform^a

^aAdapted from ref 14. Copyright 2016 American Chemical Society.

microscope table (detailed description in the [Supporting Information](#)). Different solutions were pumped into the chip via a computer controlled pump system (neMESYS Cetoni GmbH). For this, the filled glass syringes purchased from ILS Germany GmbH were connected via Teflon capillaries with an inner diameter of 0.5 mm (WICOM GmbH) to the chip. The channel walls were silanized prior to the measurements; thus, the aqueous solutions formed droplets in the continuous phase of the mineral oil. For assessing the detection limits and dynamic range of the LoC-SERS technique when NTX is solved in purified water, the Ag NPs were pumped via port 1, NTX aqueous solutions at different concentrations (between 1 and $100\ \mu\text{M}$) via port 3, while the 1 M KCl solution was injected via port 4. For the experiments carried out with human urine samples, port 1 was used for the Ag NPs and port 3 for the samples.

Data Processing. The data analysis was carried out with in-house written algorithms (GnuR).²⁰ The reference Raman and SERS spectra were background corrected with the selective nonlinear iterative peak clipping (SNIP) method²¹ and cut to the $200\text{--}1650\ \text{cm}^{-1}$ fingerprint region. The spectra recorded with the LoC-SERS setup were first separated in two groups by k-means cluster analysis. The first group contained the recorded mineral oil spectra, whereas the second one pure droplet and mixed droplet-oil spectra. This was followed by a wavenumber calibration, where mineral oil was used as standard.²² The separation of the mixed and pure droplet spectra was achieved by manually setting a threshold value for the intensity of the prominent oil marker band at around $2880\ \text{cm}^{-1}$. Afterward, stacks of three spectra recorded within one droplet were averaged, background corrected (SNIP, 45 iterations) and cut to the wavenumber region of interest.

In order to quantify the amount of NTX in highly diverse human urine samples, two different approaches based on the SAM were applied. A straightforward, univariate analysis based on the linear dependency of the peak area of the NTX Raman marker band located at $840\ \text{cm}^{-1}$ was first performed. The peak area was calculated according to Simpson's rule. The second approach made use of the multivariate curve resolution alternating least-squares (MCR-ALS) algorithm.

MCR is widely used for decomposing mixed spectral data of a multicomponent system into a bilinear model consisting of the pure contributions of each single component.^{17,18,23,24} The decomposition is based on the following equation:

$$D = \sum_i c_i s_i^T + E = C S^T + E$$

D ($m \times n$) is the data matrix and it is composed of m spectra of mixture samples containing i substances in different concentrations. The score and loading vectors, c_i and s_i , can be interpreted as the pure profiles of the evolving parameter, e.g., concentration or elution time, and the spectra of the single components, respectively. The matrix E contains all variances that are unexplained in the framework of the assumed bilinear model. The most common method for the calculation of the pure contributions is the application of iterative algorithms, like the iterative target transformation factor analysis (ITTFA) or ALS.^{25,26} In addition, chemical not meaningful results can be avoided by introducing constraints, like non-negativity, to the optimization process.

In order to combine this approach with SAM, the spectra of the unknown sample as well as the ones originating from the samples with added standard were arranged in a matrix (in rows). Assuming a two component system, the spectra of the sample matrix (pure urine) and an aqueous NTX solution were used as initial guesses for the pure spectral components. On the basis of this, the optimization process started with estimating the values of the score matrix, which are proportional to the concentration profiles. After reaching the convergence criterion, the score values of the analyte component were utilized as a pseudounivariate values. The unknown concentration and the corresponding standard deviation was calculated from the zero of the linear fit function. During the optimization by means of MCR-ALS, the score as well as the loading values were constrained to be non-negative and the threshold for the convergence criteria was chosen to be 1×10^{-3} at a maximum number of iterations of 200.

RESULTS AND DISCUSSION

SERS Detection of NTX. In Figure 1 the chemical structure of the molecule is depicted together with the Raman spectrum

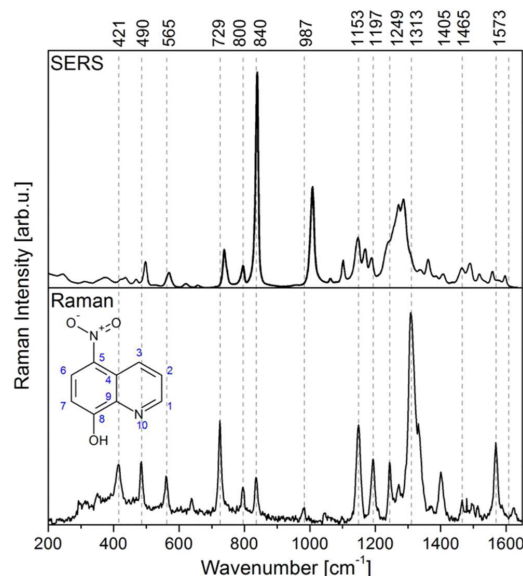


Figure 1. Reference Raman and SERS spectra of NTX powder (@785 nm) and 100 μ M NTX/H₂O (@532 nm).

of NTX powder and the SERS spectrum of NTX solved in purified water at 100 μ M. NTX is a quinolone derivative with an OH group bound to the carbon atom at the eighth position and a nitro ($-\text{NO}_2$) group at the fifth position. The molecule has C_s point group symmetry with 54 fundamental modes of vibrations, out of which 39 are in-plane and 15 are out-of-plane modes.²⁷ The Raman spectrum of the NTX powder has a very rich fingerprint in the 200–1800 cm^{-1} spectral range. The detailed vibrational analysis based on density functional theory (DFT) calculations was previously reported by Arjunan et al.,²⁷ and the band assignments of the marked Raman bands in Figure 1 are summarized in Table S3. Briefly, CCC bending modes give rise to Raman bands centered at 421 cm^{-1} and at 565 cm^{-1} . The Raman bands in the 800–1160 cm^{-1} spectral range are due to the aromatic C–H vibrations, whereas the ones at 729 and 1405 cm^{-1} are assigned to the vibrations of the hydroxyl group. The strongest Raman band is located at 1313 cm^{-1} and it is caused by the C–O stretching mode, while the signal at 490 cm^{-1} is assigned to the same functional group. The C–N stretching vibration is associated with the Raman band at 1197 cm^{-1} , the C–NO₂ stretching with the one at 1249 cm^{-1} , and the C=N stretching with the weak band at 1465 cm^{-1} . Finally, C=C stretching of the aromatic rings give rise to the Raman band at 1573 cm^{-1} .

For enhancing the inherently weak Raman scattering, in the present study, Ag NPs prepared according to the Leopold–Lendl protocol were used. During measurements, the ratio between the Ag NPs and the NTX solution was kept constant (1 to 1). After mixing the two solutions in a cuvette, 1 M KCl was added to induce the creation of hot-spots. The recorded

UV–vis spectra of the bare Ag NPs, of NTX, and of the Ag NPs and NTX mixtures are showed in Figure S1.

The reference SERS spectrum presented in Figure 1 is significantly differing from the Raman spectrum recorded on powder. Namely, the Raman bands located at 840 cm^{-1} and at 987 cm^{-1} are strongly enhanced, whereas the ones in the 1200–1350 cm^{-1} range are strongly convoluted. For a better visualization, the two spectra presented in Figure 1 were normalized to the intensity of the Raman band centered at 800 cm^{-1} (Figure S2). This band was chosen because its intensity is not significantly influenced by the presence of the metallic nanoparticles. By comparing the normalized spectra, it was observed that the intense C–O stretching band at 1313 cm^{-1} is downshifted by ~ 25 cm^{-1} and the C=N stretching mode at 1465 cm^{-1} is also enhanced. The strong influence of the presence of the Ag NPs on the overall SERS spectrum might indicate a chemisorption of the molecule on the metallic surface.

By closely analyzing the SERS spectrum, it can be noticed that even though the Raman bands at 800 and 840 cm^{-1} have been assigned to the out-of-plane bending vibration of the same functional group, the later one is significantly enhanced in the SERS spectrum as compared with the former one. The same observation is valid for the two Raman bands assigned to the C–H in-plane bending vibration at 987 and 1153 cm^{-1} . Generally, it is expected, that bands associated with the same vibrational mode will be equally influenced by the local electromagnetic field of the plasmonic structures. Because this is not the case, the two bands cannot be assigned to the same mode. Before a correct description of the molecule orientation on and interaction with the metallic surface can be given, further vibrational analysis of NTX has to be performed, which is beyond the aim of the study.

Detection in Purified Water. The MIC values of NTX against uropathogens are between 10 and 40 μ M (2–8 mg/L). These are the minimum concentrations of the antibiotic at which the growth of bacteria are inhibited. Thus, after drug administration, its concentration in urine has to reach this value. In order for an analytical method to be successful in NTX detection in human urine, its sensitivity has to be higher as compared with the MIC.

To assess the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of NTX solvated in high-purity water, LoC-SERS measurements were performed. For this, NTX solutions at different concentrations (see Table S4) were filled in glass syringes. The first test measurements were done by pumping the NTX containing solution at port 1, high-purity water at port 3, the Ag NPs at port 4, and the 1 M KCl solution at port 5 (see Scheme 2). The focus of the laser beam was fixed in the middle of the third channel. Contrary with the SERS signals obtained in cuvettes, the recorded SERS spectra at low NTX concentrations were identical with the Raman spectrum of purified water (Figure S3). This behavior can be explained by considering the polarity of the molecule. Generally, when SERS measurements with segmented flow platforms are performed, the target molecule must have good water solubility. Otherwise, the molecule might diffuse into the organic medium used as carrier fluid. The solubility of NTX is limited in water. Because of the quinolone backbone, the molecule is also soluble in organic solvents. Therefore, in the microfluidic chip it will diffuse from the aqueous droplet to the mineral oil used as continuous phase and the recorded SERS spectra will be very weak. In order to prove this hypothesis, 500 μ L of NTX at 100

μM was mixed in an eppendorf tube with 500 μL mineral oil. The eppendorf tube was rigorously shaken and after the two phases separated 100 μL of the aqueous phase was added to 100 μL of Ag NPs followed by KCl addition. The same experiment was repeated with tetradecane and with heptane. The recorded SERS spectra are shown in Figure S4. The signal intensity is decreased ~ 20 times after mixing the NTX with an organic solution. Thus, this is a clear indication of the NTX diffusion toward the organic phase. However, if the NTX solution is first mixed with the Ag NPs and only afterward mineral oil is added in the eppendorf tube, the signal loss is inhibited. This can be explained by a high affinity of the NTX molecule toward the metallic surface, confirming once again the chemisorption of the molecule on the Ag NPs. According to these results, the NTX solution and the colloids have to mix before the target molecule can diffuse to the mineral oil. This is easily done by pumping the two solutions through port 1 and port 3 and the KCl solution through port 4 or port 5. The as-recorded SERS spectra were background corrected and their mean signal and double standard deviation are plotted in Figure 2A.

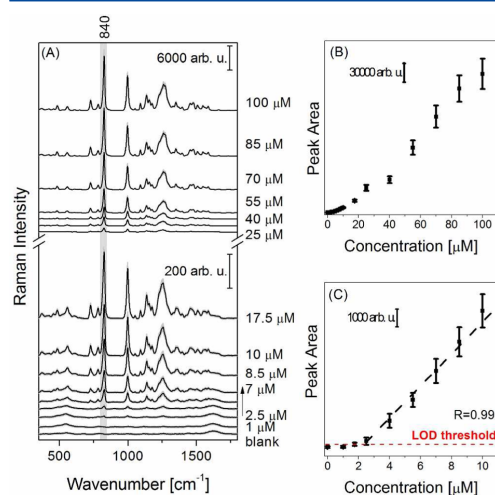


Figure 2. (A) Mean SERS spectra and their double standard deviation of NTX/ H_2O . (B) Peak area of the 840 cm^{-1} Raman mode. (C) LOD of NTX ("R" is the adjusted R square value).

The characteristic Raman bands of NTX can be clearly identified at 2.5 μM (0.47 mg/L). According to the IUPAC definition, the LOD is equal to the signal of the blank plus 3 times its standard deviation, while LOQ is equal to the signal of the blank plus 10 times its standard deviation. The Raman band at 840 cm^{-1} was integrated with the Simpson rule. The peak area for all measured concentrations is plotted in Figure 2B, whereas Figure 2C presents the 0–10 μM range. On the basis of these plots, the LOD for NTX solved in purified water is ~ 2.38 μM (0.47 mg/L), while the LOQ is ~ 2.76 μM (0.52 mg/L). This value is 5 times lower than the lowest MIC value of uropathogens. Therefore, SERS fulfils the required sensitivity for NTX detection. The peak area has a linear dependency as a function of the concentration for the 2.5–10 μM (0.47–1.9 mg/L) range, while the dynamic range extends up to 85 μM . At

this concentration the so-called poisoning effect appears, when the further addition of analyte molecules does not lead to signal increase.

Human Urine as Matrix for NTX Detection. The chemical composition of urine is very complex because the kidneys extract a high variety of molecules from the bloodstream. Additionally, Raman spectroscopy has high fingerprint specificity. These two factors will lead to a very complex SERS spectrum for the urine samples making it challenging to detect one specific molecule. In the previous section it was proved that the NTX molecule is chemisorbed with a high chemical affinity toward the silver metallic surface. As next, it will be shown that this also offers a great advantage for its detection in complex matrices.

The three human urine samples were randomly collected from a healthy volunteer. Eight solutions with different NTX urinary concentrations (4.28 μM , 7.5 μM , 10.7 μM , 17.1 μM , 23.5 μM , 30 μM , 36.4 μM , 42.8 μM) were prepared by mixing seven parts of human urine with three parts of aqueous solution containing the target molecule. Because of the high salt content of urine samples no aggregation agent was added to induce the creation of hot-spots. The recorded mean SERS spectra of sample HV1 at different concentrations are presented in Figure 3A.

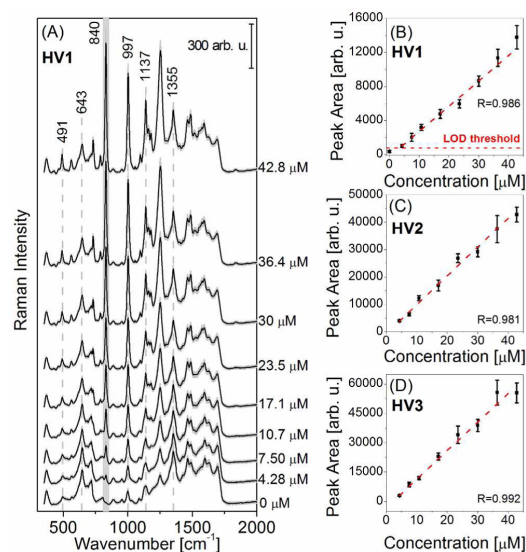


Figure 3. (A) Mean SERS spectra and their double standard deviation of sample HV1. Integrated peak area of the Raman band @840 cm^{-1} for sample (B) HV1, (C) HV2 and (D) HV3 ("R" is the adjusted R square value).

The SERS signal of the pure urine sample (0 μM) shows Raman bands located at 491 cm^{-1} , at 643 cm^{-1} , and at 1139 cm^{-1} ascribed to the vibrational modes of the uric acid molecule, at 997 cm^{-1} assigned to the C–N stretching vibration of urea, and at 1355 cm^{-1} because of the pyrrole half-ring symmetrical stretch within the heme molecule.^{14,28} When NTX is added, at the lowest concentration, to the human urine sample a new band appears at 840 cm^{-1} , while the one at ~ 1000 cm^{-1} increases in intensity. In the 1100–2000 cm^{-1}

spectral range, the Raman modes of the molecules present in the urine sample are strongly convoluted with the ones ascribed to the vibrational modes of NTX molecule. In Figure S5 a clear comparison of the reference SERS spectrum of NTX in water with the SERS spectrum of the blank urine (sample HV1) and the SERS spectrum of NTX spiked in human urine at $42.8 \mu\text{M}$ urinary concentration is presented. On the basis of this, because of the high chemical affinity of the target molecule, the Raman bands characteristic for the molecules of the complex matrix are suppressed. At high NTX concentration, just two bands, 643 cm^{-1} and the one at 1355 cm^{-1} , are still distinguishable. In order to clearly visualize the response of the signal to the concentration increment, the peak area of the Raman mode at 840 cm^{-1} was determined by the Simpson algorithm and plotted in Figure 3B–D for the three measured samples. On the basis of this, the LOD for NTX spiked in human urine (sample HV1) is $\sim 3.43 \mu\text{M}$ (0.57 mg/L) and the LOQ is $\sim 6.5 \mu\text{M}$ (1.23 mg/L). The LOD value is comparable with the LOD previously obtained for NTX solved in water ($2.38 \mu\text{M}$), while the LOQ is increased due to the background signal of the molecules originating from the human urine sample. Nevertheless, the molecules of the complex matrix do not inhibit the efficient absorption of NTX on the surface of the Ag NPs. This would not be possible without a high chemical affinity of the target molecule toward the metallic surface.

Besides good sensitivity, the LoC-SERS method also offers sufficient linear analytical response. For all three measured samples a linear range between 4.28 and $42.8 \mu\text{M}$ can be seen in Figure 3, which covers the MIC values of common uropathogens. The different behavior, as compared with the case when NTX was solved in purified water, might come from the different chemical environment. Factors which might play a major role are the inorganic salts¹⁴ present in the complex matrix and the pH of the urine samples.

LoC-SERS-SAM. The concentration determination of antibiotics in samples originating from patients cannot be done by an *a priori* established calibration curve. Instead, a new calibration has to be performed for each sample by using SAM. A good linear analytical response is a prerequisite for the successful determination of analyte concentrations by this method. In the previous section it was demonstrated, that for the three urine samples randomly collected from a healthy volunteer this requirement is fulfilled by LoC-SERS.

As none of the individuals consumed NTX before urine sample collection, for SAM measurements the clinical samples had to be simulated. In the present study the “unknown” concentration to be determined was chosen to be $\sim 21 \mu\text{M}$ (4 mg/L). This is equivalent with an in-droplet concentration, the concentration of NTX in the final volume containing urine and water, of $10.5 \mu\text{M}$. Two samples collected from the healthy volunteer (HV4 and HV5) and five samples (PS1–PS5) received from the Institute of Medical Microbiology, University Hospital Jena were used as a matrix for assessing the feasibility of the LoC-SERS-SAM combination. Besides the solutions measured by applying SAM also, the blank urine samples diluted with only water were recorded. These spectra were employed as negative control for our study.

The mean SERS spectra of the blank urine samples, of the “unknown” solution and of the four SAS are plotted in the Supporting Information, Figure S6. According to these plots, the SERS signals of six out of seven blank urine samples diluted to 50% are similar to the one shown in Figure 3 for sample HV1. The SERS spectrum of the blank PS2 sample shows a

very intense Raman band at $\sim 1355 \text{ cm}^{-1}$. This band was previously assigned to the pyrrole half-ring symmetrical stretch within the heme molecule. Hence, it might indicate that the sample contained traces of blood.

Regardless of the signal of the complex matrix, the NTX characteristic bands are clearly distinguishable for all seven samples at the “unknown” concentration. With the addition of the standard solution, the signal intensity of the marked Raman mode at 840 cm^{-1} is increasing. In order to predict the unknown concentration, both uni- and multivariate statistical tools have been applied. For the first case, the unknown concentration was calculated based on the peak area of the Raman at 840 cm^{-1} . In Figure 4 the integrated peak areas are

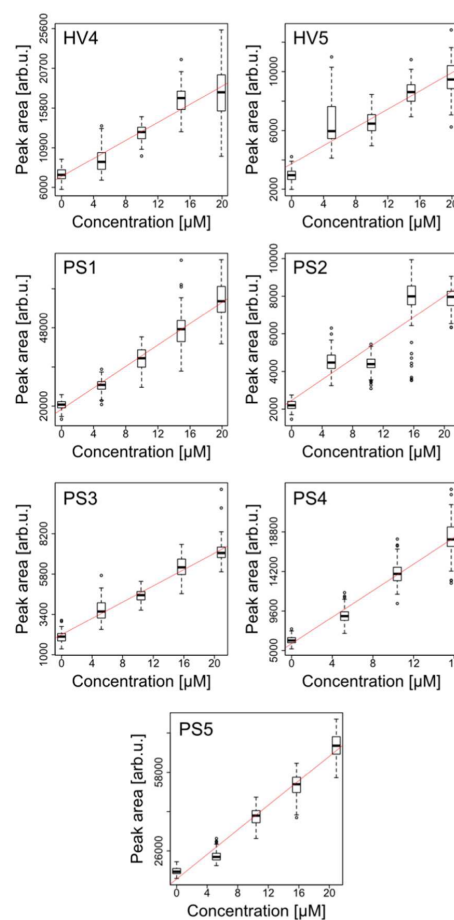


Figure 4. LoC-SERS-SAM: linear fit of the peak area @ 840 cm^{-1} vs the concentration of the NTX standard solution.

shown in the form of boxplots. On the x scale, the concentration of the standard addition steps (c_{SAS} , see Table S2) are represented. The obtained predictions are expressed in in-droplet NTX concentration (true value $10.5 \mu\text{M}$) instead of the urinary concentration (true value $21.0 \mu\text{M}$). The linear fit was performed with the algorithm written in the statistical language R. The unknown NTX in-droplet concentration was

Table 1. LoC-SERS-SAM Results and Their Corresponding 95% Confidence Intervals^a

S	peak area			MCR-ALS		
	c_0 [μM]	E_r [%]	c_{NC} [μM]	c_0 [μM]	E_r [%]	c_{NC} [μM]
HV4	13.2 \pm 1.0	25.6	2.1 \pm 0.5	14.0 \pm 1.0	33.9	1.8 \pm 0.5
HV5	12.1 \pm 1.1	15.0	2.7 \pm 0.6	10.1 \pm 0.9	3.8	0.5 \pm 0.5
PS1	9.9 \pm 0.6	6.1	0.1 \pm 0.3	10.1 \pm 0.6	4.0	1.1 \pm 0.3
PS2	9.1 \pm 0.8	14.2	0.5 \pm 0.5	9.8 \pm 1.0	7.8	1.9 \pm 0.3
PS3	9.0 \pm 0.5	14.7	0.7 \pm 0.4	11.5 \pm 0.6	8.9	0.0 \pm 0.3
PS4	7.5 \pm 0.4	29.2	1.1 \pm 0.2	6.0 \pm 0.4	43.7	0.6 \pm 0.6
PS5	5.8 \pm 0.4	45.1	1.6 \pm 0.2	5.6 \pm 0.4	46.9	0.8 \pm 0.3

^aTrue value is 10.5 μM . c_0 , in-droplet NTX concentration; c_{NC} , predicted NTX concentration for the blank sample (in-droplet).

predicted to be between 5.8 μM and 13.2 μM (Table 1 and Table S3). The best prediction was obtained for sample PS1 with a relative error of 6.1%. The mean absolute percentage error (MAPE) for all predictions is 21.4%. The feasibility of the LoC-SERS-SAM technique was additionally tested by considering as the sample with an “unknown” concentration the blank urine sample. With these parameters, the predicted concentration is 1 order of magnitude lower than the true concentration.

The determination of the unknown concentration based on this univariate statistic method will fail in the case of analytes presenting Raman bands strongly convoluted with the urine background. This is the case for the Raman band located at $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$. If the unknown NTX concentration is predicted based on the peak area of this vibrational mode, the MAPE increases to 144% (see Table S3 in the Supporting Information for details).

As an alternative analysis method, MCR-ALS was tested. For this, instead of a single Raman band, a spectral range can be selected. In the case of NTX, the 600–1100 cm^{-1} spectral window without background correction provided the best prediction. The MCR-ALS recovered spectra for the two components, urine and NTX in water, are presented in comparison with the reference spectra, applied as initial guesses, in Figure S7 in the Supporting Information. The recovered spectra show good similarity with the reference ones and a correlation of 0.89–0.99 (see Table S6) was achieved. Consequently, NTX can be determined from convoluted spectral information. The as calculated unknown concentrations are presented in Table 1 (and Table S5). Four out of seven samples were predicted with a relative error below 10% as compared with only one in the case of the univariate analysis, whereby the results for the negative control are comparable. Nevertheless, the MAPE is with 21.1% in the same range as for the univariate statistics.

Regardless of the applied data analysis, predictions with significant relative error were obtained for samples HV4, PS4, and PS5. The linearity of the signal for the last two samples fulfills the requirements of SAM. Thus, the source of the error might come from the actual measurements and not from the applied statistical method. Nevertheless, because of the reduced available sample volume, the measurements could not be repeated.

Overall, the univariate statistical analysis is a straightforward method; however, in the case of convoluted Raman bands the prediction will fail. MCR-ALS can be performed on selected spectral range instead of a single Raman band and without prior background correction. This will reduce the artifacts induced by algorithms for estimating the background/baseline of the recorded spectra. Furthermore, in order to compare the

performance of the two applied statistical methods, one might calculate a new MAPE value by omitting samples HV4, PS4, and PS5. For MCR-ALS, the as calculated value is 6.2%. By comparing this with the value obtained for the univariate method, 12.5%, the superiority of MCR-ALS is clearly demonstrated. However, in order to apply MCR-ALS, the reference spectrum of the pure urine samples has to be known. This will not be available for clinical samples. One solution for this challenge is to acquire a comprehensive database containing the background signature of urine samples originating from various individuals. On the basis of this database, a series of MCR-ALS runs, with different initial guesses, can be performed. The regression parameters corresponding to the fitted curves with the highest correlation to their initial guesses will be used for the prediction of the unknown concentration.

CONCLUSIONS

The high chemical affinity of NTX toward the surface of the silver nanoparticles observed in the present study plays a major role in its successful detection by the SERS technique. The achieved LOD values in purified water and in human urine samples are lower than the minimum concentration of the antibiotic needed to inhibit bacterial growth. Therefore, LoC-SERS offers sufficient sensitivity for the detection of NTX at relevant clinical concentrations. Concerning the linear response of the signal at the detector vs the antibiotic concentration, it was noticed, that in the case of the complex matrix the linear range is significantly extended as compared with the case when just purified water was used as matrix. This might be due to either the different pH value of the complex matrix or due to the presence of various molecules beside NTX.

Signal linearity is one of the prerequisites for the successful quantification of molecules either by the traditional method, with *a priori* established calibration curves, or by SAM. Because of the variation of the chemical composition of clinical samples and the quality variation of colloid batches, SAM is the most feasible approach for quantification when SERS is used as a detection method. In the present study it was demonstrated that by applying various statistical methods for data analysis, the unknown concentration of NTX in human urine can be determined.

In conclusion, LoC-SERS-SAM is a very promising analytical tool for drug quantification in human urine samples. Furthermore, because of the available miniaturized Raman setups, the costs of the method can be significantly reduced, making it accessible for small clinical centers.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.analchem.6b02316](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02316).

Sample preparation: urinary NTX concentrations measured for samples HV1, HV2, and HV3 and LoC-SERS-SAM; band assignment of the observed Raman modes of NTX; UV-vis measurements; normalized Raman and SERS spectrum of NTX powder and 100 μ M solution; LoC-SERS spectra measured with conventional configuration; chemical affinity of NTX toward Ag NPs: SERS spectra of various mixtures; reference SERS spectrum of NTX vs LoC-SERS signal of the blank urine and of NTX spiked in the urine sample HV1; mean SERS spectra and their double standard deviation of urine samples from healthy volunteer and UTI patients; LoC-SERS-SAM results; MCR-ALS plots; and correlation coefficients for MCR-ALS (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +49 (0)3641-206309. Fax: +49 (0)3641-206399. E-mail: dana.cialla-may@uni-jena.de.

Author Contributions

¹I.J.H. and M.J. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The funding of the Ph.D. project of I. J. Hidi in the framework "Carl-Zeiss-Strukturmaßnahme" is gratefully acknowledged. The projects "Jenaer Biochip Initiative 2.0" (Grant 03IPT513Y) in the framework "InnoProfile Transfer-Unternehmen Region" as well as the Grant 01KI1204 (M. W. Pletz) are supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF). BioInter (Grant 13022-715) and InfectoGnostics (Grant 13GW0096F) are funded by the Development Bank of Thuringia and the European Union (EFRE). We thank the microfluidic group of the IPHT for preparing the lab-on-a-chip devices for the measurements.

■ REFERENCES

- (1) Gupta, K.; Hooton, T. M.; Naber, K. G.; Wullt, B.; Colgan, R.; Miller, L. G.; Moran, G. J.; Nicolle, L. E.; Raz, R.; Schaeffer, A. J.; Soper, D. E. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, 52, e103–e120.
- (2) Fraser, R. S.; Creanor, J. *Eur. J. Biochem.* **1974**, 46, 67–73.
- (3) Pelletier, C.; Prognon, P.; Bourlioux, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 707–713.
- (4) Kresken, M.; Körber-Irrgang, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 7019–7020.
- (5) Naber, K. G.; Niggemann, H.; Stein, G.; Stein, G. *BMC Infect. Dis.* **2014**, 14, 1–16.
- (6) Mrhar, A.; Kopitar, Z.; Kozjek, F.; Presl, V.; Karba, R. *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* **1979**, 17, 476–481.
- (7) NAK - Nationales Antibiotika-Sensitivitätstest -Komitee. *Nitro-xoline: Rationale for the clinical breakpoints*, version 1.0; 2014.
- (8) Wagenlehner, F. M. E.; Munch, F.; Pilatz, A.; Barmann, B.; Weidner, W.; Wagenlehner, C. M.; Straubinger, M.; Blenk, H.; Pfister, W.; Kresken, M.; Naber, K. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 713–721.
- (9) Sorel, R. H. A.; Snelleman, C.; Hulshoff, A. J. *Chromatogr., Biomed. Appl.* **1981**, 222, 241–248.
- (10) Ghoneim, M. M.; El-Desoky, H. S.; Abdel-Galeil, M. M. *Bioelectrochemistry* **2011**, 80, 162–168.
- (11) Buividas, R.; Dzingelevičius, N.; Kubiliūtė, R.; Stoddart, P. R.; Khanh Truong, V.; Ivanova, E. P.; Juodkazis, S. *J. Biophoton.* **2015**, 8, 567–574.
- (12) Yuen, C.; Liu, Q. *J. Biophoton.* **2014**, 7, 683–689.
- (13) Strelau, K. K.; Kretschmer, R.; Moller, R.; Fritzsche, W.; Popp, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 1381–1384.
- (14) Hidi, I. J.; Jahn, M.; Pletz, M. W.; Weber, K.; Cialla-May, D.; Popp, J. *J. Phys. Chem. C* **2016**, DOI: [10.1021/acs.jpcc.6b01005](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01005).
- (15) Zhou, Q.; Kim, T. *Sens. Actuators, B* **2016**, 227, 504–514.
- (16) Kammer, E.; Olschewski, K.; Stockel, S.; Rosch, P.; Weber, K.; Cialla-May, D.; Bocklitz, T.; Popp, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 8925–8929.
- (17) Mamian-Lopez, M. B.; Poppi, R. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 7671–7677.
- (18) Mamian-Lopez, M. B.; Poppi, R. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 760, 53–59.
- (19) Leopold, N.; Lendl, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 5723–5727.
- (20) R Development Core Team. R; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2011.
- (21) Ryan, C. G.; Clayton, E.; Griffin, W. L.; Sie, S. H.; Cousens, D. *R. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **1988**, 34, 396–402.
- (22) März, A.; Bocklitz, T.; Popp, J. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 8337–8340.
- (23) de Juan, A.; Jaumot, J.; Tauler, R. *Anal. Methods* **2014**, 6, 4964.
- (24) Villa, J. E. L.; Poppi, R. J. *Analyst* **2016**, 141, 1966–1972.
- (25) Lyndgaard, L. B.; van den Berg, F.; de Juan, A. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2013**, 125, 58–66.
- (26) de Juan, A.; Rutan, S. C.; Tauler, R. In *Comprehensive Chemometrics*; Elsevier: Oxford, U.K., 2009; pp 325–344.
- (27) Arjunan, V.; Balamourougane, P. S.; Kalaivani, M.; Raj, A.; Mohan, S. *Spectrochim. Acta, Part A* **2012**, 96, 506–516.
- (28) Chi, J. M.; Zaw, T.; Cardona, I.; Hosnain, M.; Garg, N.; Lefkowitz, H. R.; Tolias, P.; Du, H. *Biomed. Opt. Express* **2015**, 6, 761–769.

LoC-SERS Combined with the Standard Addition Method: Toward the Quantification of Nitroxoline in Spiked Human Urine Samples

Izabella J. Hidi,^{1,2,‡} Martin Jahn,^{1,2,‡} Karina Weber,^{1,2,4} Thomas Bocklitz,¹ Mathias W. Pletz,^{3,4} Dana Cialla-May,^{1,2,4*} Juergen Popp^{1,2,4}

¹Friedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Helmholtzweg 4, 07745 Jena, Germany

²Leibniz Institute of Photonic Technology Jena, Albert-Einstein-Str. 9, 07745 Jena, Germany

³Center for Infectious Diseases and Infection Control, Jena University Hospital, Erlanger Allee 101 07740 Jena

⁴Research Campus Infectognostic, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Germany, Germany

*corresponding author: Phone: +49 (0)3641-206309; Fax: +49 (0)3641-206399, e-mail: dana.cialla-may@uni-jena.de

Supporting Information

Table of Content:

Table **S1** Sample preparation – Urinary NTX concentrations measured for sample HV1, HV2 and HV3;

Table **S2** Sample preparation – LoC-SERS-SAM;

Table **S3** Band assignment of the observed Raman modes of NTX;

Figure **S1**: UV-Vis measurements;

Figure **S2**: Normalized Raman and SERS spectrum of NTX powder and 100 μ M solution;

Figure **S3**: LoC-SERS spectra measured with conventional configuration.

Figure **S4**: The chemical affinity of NTX toward Ag NPs: SERS spectra of various mixtures;

Figure **S5**: Reference SERS spectrum of NTX vs. LoC-SERS signal of the blank urine and of NTX spiked in the urine sample HV1;

Figure **S6**: Mean SERS spectra and their double standard deviation of urine samples from healthy volunteer and UTI patients;

Table **S4**, Table **S-5** and Table **S-6**: LoC-SERS-SAM results;

Figure **S7**: MCR-ALS plots,

Table **S7**: correlation coefficients for MCR-ALS.

Table S1. Sample preparation – Urinary NTX concentrations measured for sample HV1, HV2 and HV3.

$c_{\text{NTX}/\text{H}_2\text{O}}$ [μM]	$c_{\text{NTX}/\text{in-droplet}}$ [μM]	$c_{\text{NTX}/\text{urine}}$ [μM]
10	3.0	4.28
17.5	5.25	7.50
25	7.50	10.70
40	12.00	17.10
55	16.50	23.50
70	21.00	30.00
85	25.50	36.40
100	30.00	42.80

Obs.: NTX/H₂O solution at different concentrations ($c_{\text{NTX}/\text{H}_2\text{O}}$) was mixed with the urine sample in 3:7 ratio. $c_{\text{NTX}/\text{in-droplet}}$ represents the concentration of NTX in the total volume ($V_{\text{NTX}/\text{H}_2\text{O}} + V_{\text{urine}}$), while $c_{\text{NTX}/\text{urine}}$ is the NTX concentration in the volume of urine.

Table S2. Sample preparation – LoC-SERS-SAM

Sample	V_{urine} [μl]	V_{spike} [μl]	V_{standard} [μl]	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [μl]
blank	250	0	0	250
unknown		76	0	174
SAS1			43.4	130.6
SAS2			87	87
SAS3			130.6	43.4
SAS4			174	0

for $c_{\text{spike}}=69.4 \mu\text{M}$ and $c_{\text{standard}}=57.4 \mu\text{M}$ (HV4 and HV5)

Sample	n_{spike} [mol]	n_{standard} [mol]	n_{total} [mol]	$c_{\text{NTX}/\text{urine}}$ [M]	$c_{\text{NTX}/\text{urine}}$ [mg/l]	$c_{\text{NTX in-droplet}}$ [M]	c_{SAS} [M]
unknown	$1.05 \cdot 10^{-8}$	0	$1.05 \cdot 10^{-8}$	$2.10 \cdot 10^{-5}$	4	$1.05 \cdot 10^{-5}$	0
SAS1		$4.99 \cdot 10^{-9}$	$1.55 \cdot 10^{-8}$	$3.10 \cdot 10^{-5}$	5.89	$1.55 \cdot 10^{-5}$	$4.99 \cdot 10^{-6}$
SAS2		$9.99 \cdot 10^{-9}$	$2.05 \cdot 10^{-8}$	$4.10 \cdot 10^{-5}$	7.79	$2.05 \cdot 10^{-5}$	$9.98 \cdot 10^{-6}$
SAS3		$1.50 \cdot 10^{-8}$	$2.55 \cdot 10^{-8}$	$5.10 \cdot 10^{-5}$	9.69	$2.55 \cdot 10^{-5}$	$1.49 \cdot 10^{-5}$
SAS4		$2.00 \cdot 10^{-8}$	$3.05 \cdot 10^{-8}$	$6.10 \cdot 10^{-5}$	11.59	$3.05 \cdot 10^{-5}$	$1.99 \cdot 10^{-5}$

for $c_{\text{spike}}=70 \mu\text{M}$ and $c_{\text{standard}}=60 \mu\text{M}$ (PS1-PS5)

Sample	n_{spike} [mol]	n_{standard} [mol]	n_{total} [mol]	$c_{\text{NTX}/\text{urine}}$ [M]	$c_{\text{NTX}/\text{urine}}$ [mg/l]	$c_{\text{NTX in-droplet}}$ [M]	c_{SAS} [M]
unknown	$5.32 \cdot 10^{-9}$	0	$5.32 \cdot 10^{-9}$	$2.13 \cdot 10^{-5}$	4.04	$1.06 \cdot 10^{-5}$	0
SAS1		$2.60 \cdot 10^{-9}$	$7.92 \cdot 10^{-9}$	$3.17 \cdot 10^{-5}$	6.02	$1.58 \cdot 10^{-5}$	$5.21 \cdot 10^{-6}$
SAS2		$5.22 \cdot 10^{-9}$	$1.05 \cdot 10^{-8}$	$4.22 \cdot 10^{-5}$	8.01	$2.11 \cdot 10^{-5}$	$1.04 \cdot 10^{-5}$
SAS3		$7.84 \cdot 10^{-9}$	$1.32 \cdot 10^{-8}$	$5.26 \cdot 10^{-5}$	10.00	$2.63 \cdot 10^{-5}$	$1.57 \cdot 10^{-5}$
SAS4		$1.04 \cdot 10^{-8}$	$1.58 \cdot 10^{-8}$	$6.30 \cdot 10^{-5}$	11.98	$3.15 \cdot 10^{-5}$	$2.09 \cdot 10^{-5}$

Table S3. Band assignment of the observed Raman modes of NTX.¹

Position [cm ⁻¹]	Assignment
421	CCC out-of-plane bending
490	C-O in-plane bending
565	CCC in-plane bending
729	O-H out-of-plane bending
800	aromatic C-H out-of-plane bending
840	
987	aromatic C-H in-plane bending
1153	
1197	C-N stretching
1249	C-NO ₂ stretching
1313	C-O stretching
1405	O-H in-plane bending
1465	C=N stretching
1573	C=C stretching

Droplet based microfluidic chip

The microfluidic platform is fabricated from glass via chemical etching and anodic binding and has a size of 16x25 mm. Glass has a low Raman scattering cross section, therefore it is an ideal material for manufacturing microfluidic chips for SERS measurements. Prior to the measurements, the surface of the micro-channels was functionalized with octadecyltrichlorosilane (ODTS) in order to obtain hydrophobic channel walls. The microfluidic platform has the following operational units: a droplet generator where the aqueous solutions are dispensed into the flow of mineral oil via a T-junction, a dosing unit where further aqueous solutions are injected into the already existing droplet, two meander channels assuring an optimal mixing of the droplet content and a long measurement loop. Generally, through port 1-3 the analyte solutions and the solvent (purified water, water or urine containing the target analyte) are pumped, while the Ag nanoparticles and KCl, as aggregation agent, are injected via port 4 and 5. The flow rate of the continuous phase was fixed at 9 nl/s, the sum of the flowrates at the droplet generator was 14 nl/s and at the dosing unit 11 nl/s. The various solutions are filled into glass syringes that are connected with the chip via Teflon capillaries. The software provided with the pump system (neMESYS Cetoni GmbH) controls the flow rates and allows the preparation of droplets containing differently concentrated samples, while maintaining the droplet volume constant.

UV-Vis measurements

The UV-Vis spectra plotted in Figure S1 show the extinction profile of the bare Ag NPs, of the NTX molecule at 100 µM and the extinction bands of the Ag NPs and NTX mixture without and with KCl addition. The maximum of the extinction band due to the single particle resonance is centered at 408 nm proving the successful synthesis.^{2,3} The NTX molecule has several absorption bands. The detailed assignment of the bands is behind the purpose of the present study. When Ag NPs are mixed with NTX in a 1 to 1 ratio, the UV-Vis spectrum presents a broad band centered at 423 nm. This is the result of the convolution of the absorption band of the Ag NPs and

S-3

of the two bands of NTX at 363 nm and 448 nm. In order to achieve high SERS enhancements “hot-spots” are needed. Thus, the single spherical nanoparticles have to be aggregated after the analyte molecule is adsorbed on the metallic surface. For this, 1 M KCl solution was added in the following ratio: Ag NPs:NTX:KCl=1:1:0.1. As a consequence, in the UV-Vis spectrum the single particle resonance is diminishing in intensity and a second broad band appears at higher wavelengths. This is associated with coupled localized surface plasmon resonances originating from two or more closely related nanoparticles. The connection between the extinction spectrum and the magnitude of the electromagnetic SERS enhancements is in general indirect. The highest enhancement is obtained from the small gaps in between nanoparticles, rather from the surface of the single ones.

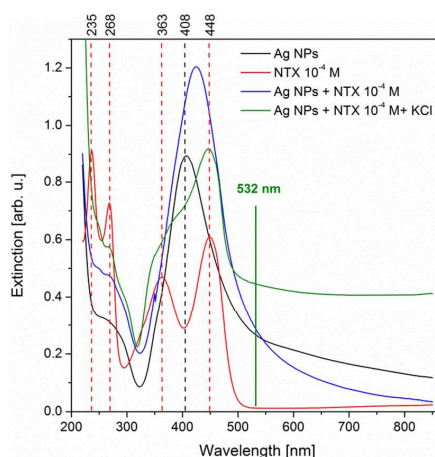


Figure S1. UV-Vis absorption spectra of Ag NPs, of NTX/H₂O at 10⁻⁴ M and of the non-aggregated and aggregated Ag NPs and NTX mixtures. (Ag NPs:NTX:KCl=1:1:0.1)

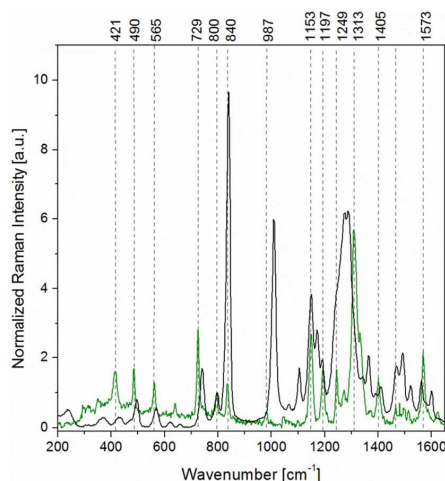


Figure S2. Normalized Raman (green) and SERS (black) spectrum of NTX powder and of an 100 μ M solution.

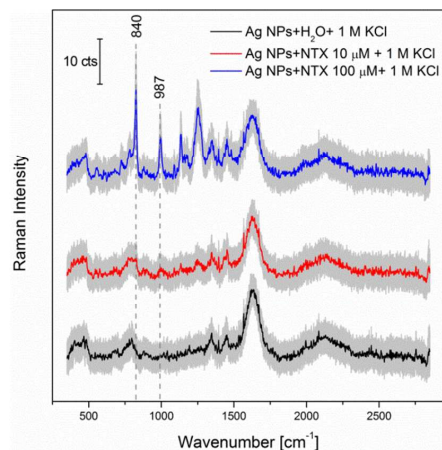


Figure S3. SERS spectra measured with the conventional configuration: port 1: NTX/H₂O, port 3: purified water, port 4: Ag NPs and port 5: 1 M KCl (chip design in Scheme 2).

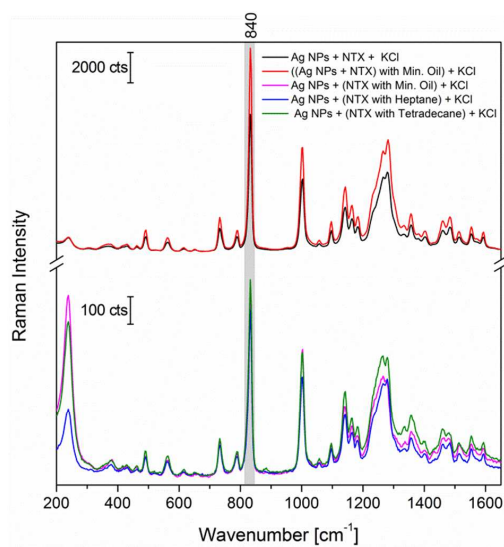


Figure S4. The chemical affinity of NTX toward Ag NPs: SERS spectra of various mixtures. NTX concentration was 100 μ M.

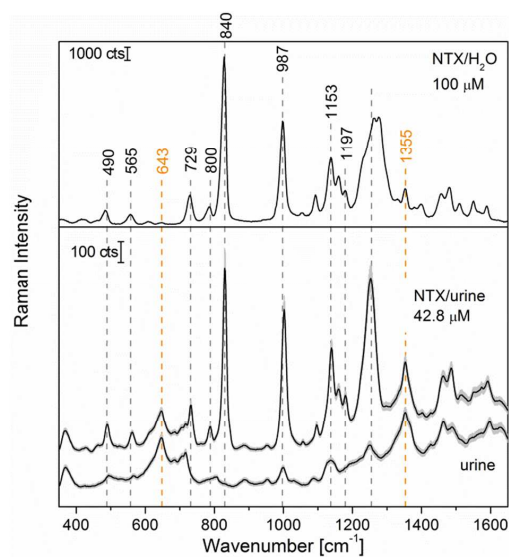


Figure S5. Reference SERS spectrum of NTX vs. LoC-SERS signal of the blank urine and of NTX spiked in the urine sample **HV1**.

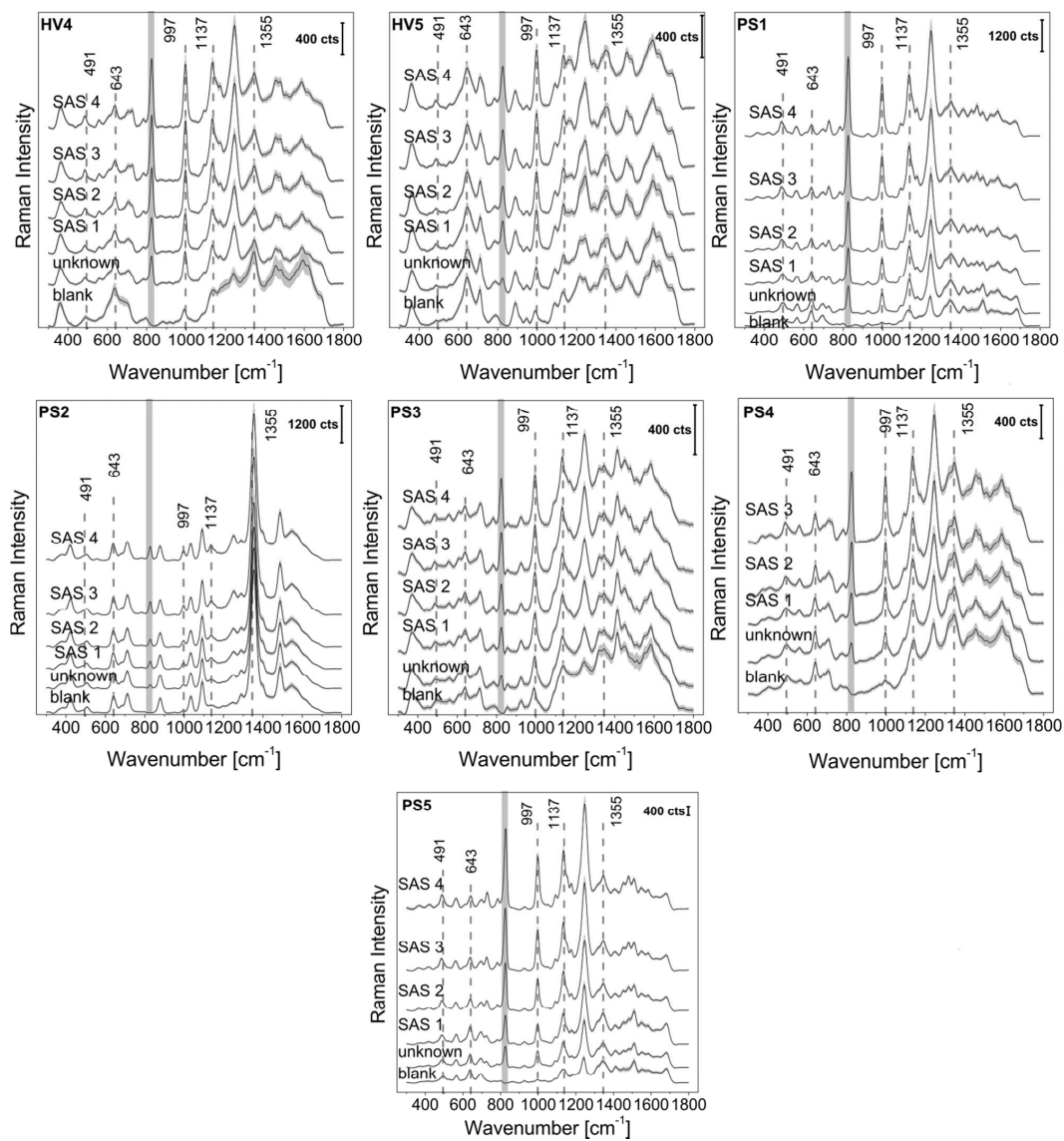


Figure S6. Mean SERS spectra and their double standard deviation of urine samples from healthy volunteer (HV) and UTI patients (PS).

Table S4. LoC-SERS-SAM results for the Raman band at $\sim 840\text{ cm}^{-1}$ based on univariate statistical analysis and their corresponding 95 % confidence intervals.

Sample	c_0 [μM]	E_r [%]	c_{unknown}		c_{NC} [μM]
			[μM]	[mg/l]	
HV4	13.2 \pm 1.0	25.6	26.4 \pm 2.1	5.0 \pm 0.4	2.1 \pm 0.5
HV5	12.1 \pm 1.1	15.0	24.1 \pm 2.2	4.6 \pm 0.4	2.7 \pm 0.6
PS1	9.9 \pm 0.6	6.1	19.7 \pm 1.3	3.7 \pm 0.2	0.1 \pm 0.3
PS2	9.1 \pm 0.8	14.2	18.2 \pm 1.7	3.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.5
PS3	9.0 \pm 0.5	14.7	18.1 \pm 1.1	3.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.4
PS4	7.5 \pm 0.4	29.2	15.0 \pm 0.9	2.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2
PS5	5.8 \pm 0.4	45.1	11.6 \pm 0.7	2.2 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2

c_0 -in-droplet NTX concertation; c_{unknown} -urinary NTX concertation; c_{NC} : predicted NTX concentration for the blank sample.

Table S5. LoC-SERS-SAM results for the Raman band at $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ based on univariate statistical analysis and their corresponding 95 % confidence intervals.

Sample	c_0 [μM]	E_r [%]	c_{unknown}		c_{NC} [μM]
			[μM]	[mg/l]	
HV4	25.5 \pm 1.6	142.7	51.0 \pm 3.1	9.7 \pm 0.6	18.6 \pm 1.1
HV5	20.7 \pm 1.4	97.5	41.5 \pm 2.7	7.9 \pm 0.5	14.1 \pm 0.9
PS1	14.5 \pm 0.8	37.9	29.0 \pm 1.5	5.5 \pm 0.3	4.9 \pm 0.4
PS2	26.9 \pm 1.9	153.7	53.8 \pm 3.7	10.2 \pm 0.7	20.7 \pm 1.3
PS3	58.0 \pm 2.9	447.6	116.1 \pm 5.9	22.1 \pm 1.1	48.3 \pm 1.8
PS4	23.1 \pm 1.1	117.6	46.1 \pm 2.1	8.8 \pm 0.4	19.1 \pm 0.8
PS5	9.1 \pm 0.4	14.0	18.2 \pm 0.9	3.5 \pm 0.2	2.3 \pm 0.4

c_0 -in-droplet NTX concertation; c_{unknown} -urinary NTX concertation; c_{NC} : predicted NTX concentration for the blank sample.

Table S6. LoC-SERS-SAM results based on MCR-ALS analysis and their corresponding 95 % confidence intervals (Student's t-test).

Sample	c_0 [μM]	E_r [%]	c_{unknown}		c_{NC} [μM]
			[μM]	[mg/l]	
HV4	14.0 \pm 1.0	33.9	27.9 \pm 2.1	5.3 \pm 0.4	1.8 \pm 0.5
HV5	10.1 \pm 0.9	3.8	20.2 \pm 1.7	3.8 \pm 0.3	0.5 \pm 0.5
PS1	10.1 \pm 0.6	4.0	20.2 \pm 1.2	3.8 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3
PS2	9.8 \pm 1.0	7.8	19.5 \pm 2.1	3.7 \pm 0.4	1.9 \pm 0.3
PS3	11.5 \pm 0.6	8.9	23.1 \pm 1.1	4.4 \pm 0.2	0.0 \pm 0.3
PS4	5.9 \pm 0.4	43.7	11.9 \pm 0.8	2.3 \pm 0.2	0.6 \pm 0.6
PS5	5.6 \pm 0.4	46.9	11.3 \pm 0.8	2.1 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3

c_0 -in-droplet NTX concertation; c_{unknown} -urinary NTX concertation; c_{NC} : predicted NTX concentration for the blank sample.

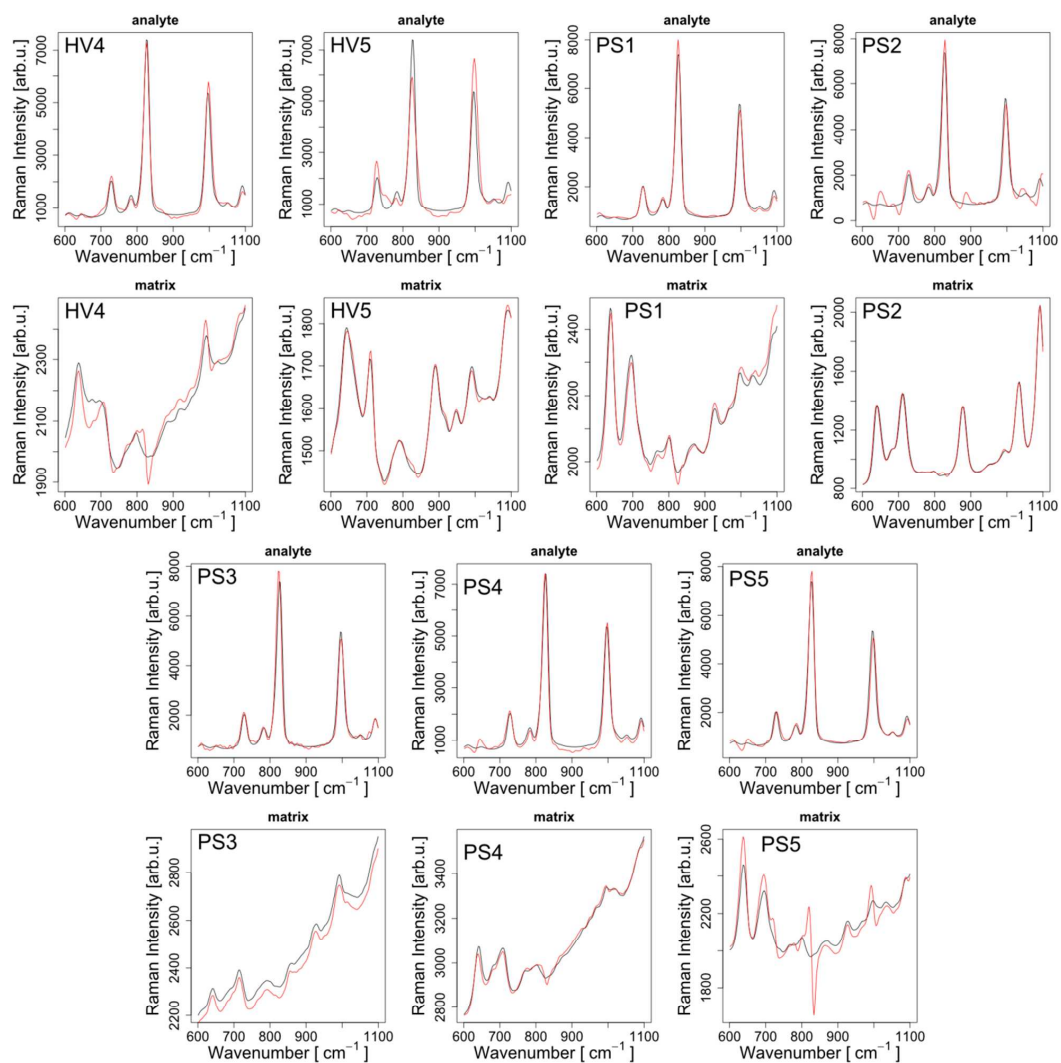


Figure S7. Reference (black) and MCR-ALS recovered (red) spectra of NTX in water (analyte) and pure urine (matrix).

Table S7. Pearson correlation coefficient of between reference and MCR-ALS recovered spectra.

Sample	r_{matrix}	r_{analyte}
HV4	0.965	0.988
HV5	0.997	0.940
PS1	0.989	0.991
PS2	0.997	0.969
PS3	0.999	0.979
PS4	0.997	0.989
PS5	0.899	0.987

References:

- [1] Arjunan, V.; Balamourougane, P. S.; Kalaivani, M.; Raj, A.; Mohan, S. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, 96, 506-516.
- [2] Leopold, N.; Lendl, B. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, 5723-5727.
- [3] Zhang, C.; Man, B. Y.; Jiang, S. Z.; Yang, C.; Liu, M.; Chen, C. S.; Xu, S. C.; Qiu, H. W.; Li, Z. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, 347, 668-672

Autorenbeiträge

Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks

Anal. Chem., 2015, 87, 2840 – 2844.

Vlastimil Peksa	Konzeptentwicklung, Durchführung der experimentellen Arbeiten, Datenanalyse und -interpretation, Erstellung des Manuskripts
Martin Jahn	Konzeptentwicklung, Durchführung von Vorexperimenten, Diskussion der Ergebnisse und des Manuskripts
Lucie Štolcová	Diskussion der Experimentplanung sowie von Ergebnissen, Korrekturlesen des Manuskripts
Volker Schulz	Durchführung der HPLC-Messungen, Diskussion der Ergebnisse
Jan Proška	Diskussion der Experimentplanung sowie von Ergebnissen, Korrekturlesen des Manuskripts
Marek Procházka	Projektleitung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Karina Weber	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Dana Ciall-May	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

Towards SERS based applications in food analytics: Lipophilic sensor layers for the detection of Sudan III in food matrices

Analytica Chimica Acta, 2015, 860, 43 – 50.

Martin Jahn	Konzeptentwicklung, Durchführung der experimentellen Arbeiten, Datenanalyse und -interpretation, Erstellung des Manuskripts
Sophie Patze	Konzeptentwicklung, Durchführung von Vorexperimenten, Diskussion der Ergebnisse
Thomas Bocklitz	Diskussion der Datenanalyse sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Karina Weber	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Dana Ciall-May	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts

LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate

Anal. Methods, 2014, 6, 3943 – 3947.

Izabella J. Hidi	Konzeptentwicklung, Durchführung der experimentellen Arbeiten und Dateninterpretation zur Konzentrationsabhängigkeit der SERS-Signale, Erstellung des Manuskripts
Anna Mühlig	Konzeptentwicklung, Durchführung der experimentellen Arbeiten pH-Wert-Abhängigkeit der SERS-Signale, Dateninterpretation fundamentaler Aspekte der Molekül-Metall-Interaktion, Erstellung des Manuskripts
Martin Jahn	Datenanalyse, Gestaltung von Abbildungen und der Titelseite
Falk Liebold	Konzeptentwicklung, Durchführung von Vorexperimenten
Dana Cialla	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Karina Weber	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

Droplet based microfluidics: spectroscopic characterization of levofloxacin and its SERS detection

Phys. Chem. Chem. Phys., 2015, 17, 21236 – 21242.

Izabella J. Hidi	Konzeptentwicklung, Durchführung der experimentellen Arbeiten sowie der Datenanalyse und -interpretation, Erstellung des Manuskripts
Martin Jahn	Datenanalyse, Diskussion der Ergebnisse
Dana Cialla-May	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Karina Weber	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts

Toward Levofloxacin Monitoring in Human Urine Samples by Employing the LoC-SERS Technique

J. Phys. Chem. C, 2016, 120, 20613 – 20623.

Izabella J. Hidi	Konzeptentwicklung, Durchführung der experimentellen Arbeiten sowie der Datenanalyse und -interpretation, Erstellung des Manuskripts
Martin Jahn	Datenanalyse, Diskussion der Ergebnisse, Erstellung des Manuskripts
Mathias W. Pletz	Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Karina Weber	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Dana Cialla-May	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

Lab-on-a-Chip-Surface Enhanced Raman Scattering Combined with the Standard Addition Method: Toward the Quantification of Nitroxoline in Spiked Human Urine Samples

Anal. Chem., 2016, 88, 9173 – 9180.

Izabella J. Hidi	Konzeptentwicklung, Durchführung der experimentellen Arbeiten sowie der Datenanalyse und -interpretation, Erstellung des Manuskripts
Martin Jahn	Datenanalyse (Erprobung unterschiedlicher multivariater Modelle), Diskussion der Ergebnisse, Erstellung des Manuskripts
Thomas Bocklitz	Datenanalyse (Erprobung unterschiedlicher multivariater Modelle), Korrekturlesen des Manuskripts
Mathias W. Pletz	Probenbereitstellung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Karina Weber	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Dana Cialla-May	Diskussion der Experimentplanung sowie der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung, Diskussion der Konzepte und der Ergebnisse, Korrekturlesen des Manuskripts

Erklärung zu den Eigenanteilen des Promovenden/der Promovendenin sowie der weiteren Doktoranden/Doktorandinnen als Koautoren an den Publikationen und Zweitpublikationsrechten bei einer kumulativen Dissertation

Publikation: V. Peksa, M. Jahn, L. Štolcová, V. Schulz, J. Proška, M. Procházka, D. Cialla-May, K. Weber, J. Popp, <i>Quantitative SERS Analysis of Azorubine (E 122) in Sweet Drinks</i> , Anal. Chem., 2015, 87, 2840 – 2844.		
Beteiligt an		
	V. Peksa	M. Jahn
Konzeption des Forschungsansatzes	X	X
Planung der Untersuchungen	X	
Datenerhebung	X	
Datenanalyse und -interpretation	X	X
Schreiben des Manuskripts	X	
Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente	1,0	0,5

Publikation: M. Jahn, S. Patze, T. Bocklitz, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, <i>Towards SERS based applications in food analytics: Lipophilic sensor layers for the detection of Sudan III in food matrices</i> , Analytica Chimica Acta, 2015, 860, 43 – 50.		
Beteiligt an		
	M. Jahn	S. Patze
Konzeption des Forschungsansatzes	X	X
Planung der Untersuchungen	X	
Datenerhebung	X	
Datenanalyse und -interpretation	X	X
Schreiben des Manuskripts	X	
Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente	1,0	0,5

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikation: I.J. Hidi, A. Mühlig, M. Jahn, F. Liebold, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, <i>LOC-SERS: Towards point-of-care diagnostic of methotrexate</i> , Anal. Methods, 2014, 6, 3943 – 3947.			
Beteiligt an			
	I.J. Hidi	A. Mühlig	M. Jahn
Konzeption des Forschungsansatzes	X	X	
Planung der Untersuchungen	X	X	
Datenerhebung	X	X	
Datenanalyse und -interpretation	X	X	X
Schreiben des Manuskripts	X	X	
Vorschlag Anrechnung	1,0	1,0	0,5
Publikationsäquivalente			

Publikation: I.J. Hidi, M. Jahn, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, <i>Droplet based microfluidics: spectroscopic characterization of levofloxacin and its SERS detection</i> , Phys. Chem. Chem. Phys., 2015, 17, 21236 – 21242.			
Beteiligt an			
	I.J. Hidi	M. Jahn	
Konzeption des Forschungsansatzes	X		
Planung der Untersuchungen	X		
Datenerhebung	X		
Datenanalyse und -interpretation	X	X	
Schreiben des Manuskripts	X		
Vorschlag Anrechnung	1,0	0,5	
Publikationsäquivalente			

Publikation: I.J. Hidi, M. Jahn, M.W. Pletz, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, <i>Towards levofloxacin monitoring in human urine samples by employing the LoC-SERS technique</i> , J. Phys. Chem. C, 2016, 120, 20613 – 20623.		
Beteiligt an		
	I.J. Hidi	M. Jahn
Konzeption des Forschungsansatzes	X	
Planung der Untersuchungen	X	
Datenerhebung	X	
Datenanalyse und -interpretation	X	X
Schreiben des Manuskripts	X	X
Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente	1,0	0,75

Publikation: I. J. Hidi, M. Jahn, T. Bocklitz, K. Weber, M. W. Pletz, D. Cialla-May, J. Popp, <i>LoC-SERS combined with the standard addition method: toward the quantification of nitroxoline in spiked human urine samples</i> , Anal. Chem., 2016, 88, 9173 – 9180.		
Beteiligt an		
	I.J. Hidi	M. Jahn
Konzeption des Forschungsansatzes	X	X
Planung der Untersuchungen	X	
Datenerhebung	X	
Datenanalyse und -interpretation	X	X
Schreiben des Manuskripts	X	X
Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente	1,0	1,0

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

Für alle in dieser kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte liegen die notwendigen Genehmigungen der Verlage („Reprint permissions“) für die Zweitpublikation vor.

Die Co-Autoren der in dieser kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte sind sowohl über die Nutzung, als auch über die oben angegebenen Eigenanteile der weiteren Doktoranden/Doktorandinnen als Koautoren an den Publikationen und Zweitpublikationsrechten bei einer kumulativen Dissertation informiert und stimmen dem zu.

Martin Jahn

_____ Name des Promovenden/der Promovendin	_____ Datum	_____ Ort	_____ Unterschrift
---	----------------	--------------	-----------------------

Ich bin mit der Abfassung der Dissertation als publikationsbasiert, d.h. kumulativ, einverstanden und bestätige die vorstehenden Angaben. Eine entsprechend begründete Befürwortung mit Angabe des wissenschaftlichen Anteils des Doktoranden/der Doktorandin an den verwendeten Publikationen werde ich parallel an den Rat der Fakultät der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät richten.

Prof. Dr. Jürgen Popp

_____ Erstbetreuer(in)	_____ Datum	_____ Ort	_____ Unterschrift
---------------------------	----------------	--------------	-----------------------

2. Weitere Publikationen

A.I. Radu, Y.Y. Ussembayev, M. Jahn, U.S. Schubert, K. Weber, D. Cialla-May, S. Höppener, A. Heisterkamp und J. Popp, ***HD DVD substrates for surface enhanced Raman spectroscopy analysis: fabrication, theoretical predictions and practical performance***, RSC Advances, 2016, 6, 44163-44169.

M. Jahn, S. Patze, I.J. Hidi, R. Knipper, A.I. Radu, A. Mühlig, S. Yüksel, V. Peksa, K. Weber, T. Mayerhöfer, D. Cialla-May und J. Popp, ***Plasmonic nanostructures for surface enhanced spectroscopic methods***, Analyst, 2016, 141, 756-793.

3. Konferenzbeiträge

Vorträge

M. Jahn, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, ***Lipophilic sensor layers for detecting Sudan dyes using surface enhanced Raman scattering***, DoKDoK, 06. – 10. Oktober 2013, Suhl, Deutschland

Poster

M. Jahn, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, ***Lipophilic sensor layers for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)***, ICORS, 12. – 17. August 2012, Bangalore, Indien

M. Jahn, S. Zierbock, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, ***Bottom-up nanostructured metallic surfaces for SERS detection of low-molecular weight substances***, BMT (DGBMT Jahrestagung), 16. – 19. September 2012, Jena, Deutschland

M. Jahn, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, ***Bottom-up nanostructured metallic surfaces for SERS detection of low-molecular weight substances***, DoK-DoK, 07. – 11. Oktober 2012, Oppurg, Deutschland

M. Jahn, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, ***Lipophile Sensorschichten zur Detektion wasserunlöslicher Moleküle mittels oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie (SERS)***, ANAKON, 04. – 07. März 2013, Essen, Deutschland

M. Jahn, S. Zierbock, F. Liebold, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, ***Strategies for the Detection of Low-Molecular Weight Substances via Surface Enhanced Raman Spectroscopy***, ICAVS, 26. – 30. August 2013, Kobe, Japan

II. Publikationen und Konferenzbeiträge

M. Jahn, S. Patze, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, ***Lipophilic sensor layers for the SERS based detection of illegal food additives***, ICORS, 10. – 15. August 2014, Jena, Deutschland

A. Radu, M. Jahn, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, ***Application of template based plasmonic substrates in food analysis***, DoKDoK, 25. – 29. September 2015, Eisenach, Deutschland

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Jahn
Geburtsdatum 28. September 1986
Geburtsort Erfurt

Bildungsweg:

Seit 03.2012 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen einer Promotion** am Institut für Physikalische Chemie,
Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät,
Friedrich-Schiller-Universität Jena

10.2009 – 02.2012 **Studium der technischen Physik (Master of Science)**
Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Technische
Universität Ilmenau

10.2006 – 12.2009 **Studium der technischen Physik (Bachelor of Science)**
Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Technische
Universität Ilmenau

Ort, Datum

Unterschrift

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Ort, Datum

Unterschrift